

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

***Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemi loomine uurimaks**

Yaf9 valgu YEATS-domeeni funktsioone

Bakalaureusetöö

(12 EAP)

Lennart Rikk

Juhendajad: PhD Kadri Peil
Prof. Arnold Kristjuhan

TARTU 2022

INFOLEHT

***Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemi loomine uurimaks Yaf9 valgu YEATS-domeeni funktsioone**

Histooni „sabade“ post-translatsioonilise modifitseerimise abil saab kontrollida kromatiini avatust mingis kindlas regioonis ning selle kaudu reguleerida transkriptsiooni. Modifitseerimiseks seonduvad histooni „sabadega“ spetsialiseerunud valgud, millel on domeenid, mis „sabade“ aminohappejääkide põhist modifitseerimismustrit ära tunnevad. Üheks selliseks domeeniks on YEATS-domeen, mida leidub *Saccharomyces cerevisiae* kolmel valgul: Yaf9, Taf14 ja Sas5. On teada, et Yaf9 YEATS-domeen on seotud transkriptsiooni reguleerimisega, kuid selle täpne funktsioon ja töömehhanismide uurimine on olnud raskendatud, kuna YEATS-domeeni eemaldamisel muutub Yaf9 valk ebastabiilseks ja seda ei ekspresseerita enam normaalsel tasemel. Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida *S. cerevisiae* tüved, kus Yaf9 valgu YEATS-domeen oleks vahetatud ära valgu Taf14 või valgu Sas5 YEATS-domeeniga ja tuvastada, kas pärm on võimeline sellist hübriidset valku ka ekspresseerima. Edasine uurimine, kuidas selline hübriidne valk rakusiseseid protsesse võib mõjutada, aitaks paremini mõista Yaf9 YEATS-domeeni funktsiooni.

Märksõnad: Yaf9, YEATS, Taf14, Sas5, kromatiin

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* model system to study the YEATS domain functions of the Yaf9 protein

Post-translational modification of histone "tails" can control the openness of chromatin in a particular region and thereby regulate transcription. To modify histone "tails", specialized proteins bind to domains that recognize an amino acid residue-based modification pattern on the "tail". One such domain is the YEATS domain, found in three proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: Yaf9, Taf14 and Sas5. The YEATS domain of Yaf9 is known to be involved in the regulation of transcription, but research on its precise function and mechanism of action has been restricted, because removal of the YEATS domain renders the Yaf9 protein unstable and it is no longer expressed at the normal levels. The present work aimed to construct new strains of *S. cerevisiae* in which the YEATS domain of the Yaf9 protein would be replaced by the YEATS

domain of the Taf14 protein or the Sas5 protein and to determine whether yeast is capable of expressing such a hybrid protein. Further research into how such a hybrid protein may affect intracellular processes would provide a better understanding of the function of the Yaf9 YEATS domain.

Keywords: Yaf9, YEATS, Taf14, Sas5, chromatin

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	4
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS.....	8
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Mudelorganism <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.2 Kromatiin.....	9
1.3 Histooidid	12
1.4 Histooidide modifitseerimine	13
1.5 YEATS-domeen.....	15
1.6 Yaf9	16
1.7 Taf14	18
1.8 Sas5	19
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja meetodika	20
2.2.1 Kasutatud tüved	20
2.2.2 Kasutatud söötmed	22
2.2.3 Kasutatud plasmiidid	22
2.2.4 Transformatsiooniks vajalike DNA fragmentide sünteesimine.....	23
2.2.5 Agaroos-geelelektroforees.....	23
2.2.6 Transformatsioon elektroporeerimise meetodil	23
2.2.7 Kolooniate kontrollimine.....	24
2.2.8 Rakulüsaadi valmistamine <i>Western blot</i> 'i jaoks.....	25
2.2.9 <i>Western blot</i>	26
2.3 Tulemused.....	28
2.3.1 Flag-epitooipi kodeeriva järjestusega DNA fragmentide sünteesimine	28
2.3.2 Flag-epitooipi järjestusega DNA fragmendi transformatsioon rakkudesse ja homoloogilise rekombinatsiooni toimumise kontrollimine	31
2.3.4 Flag-epitooipi ekspressiooni kontrollimine.....	33
2.3.5 DNA fragmendi sünteesimine Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriva osa väljavahetamiseks	34
2.3.6 Erinevaid YEATS-domeene kodeerivate järjestustega DNA fragmentide transformatsioon rakkudesse ja homoloogilise rekombinatsiooni kontrollimine.....	36

2.3.7 Hübridsete YEATS-domeeniga valkude ekspressiooni kontrollimine	39
2.4 Arutelu	41
KOKKUVÕTE.....	42
SUMMARY	43
TÄNUSÕNAD	45
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....	46
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	53
LISAD	54
LIHTLITSENTS	55

KASUTATUD LÜHENDID

AC – *acetyl* (atsetüül)

ap – aluspaari

APS – ammonium persulfaat

CENP-A – *centromere protein A* (tsentromeeri proteiin A)

C-terminaalne / C-terminus – karboksü-terminaalne

DBP – *DNA-binding protein* (DNA-ga seonduv valk)

DTT – *ditheothreitol*

H1 – histoon H1

H2A – histoon H2A

H2A.Z / Htz1 – histoon H2A.Z / Htz1

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H3K27ac – histoon **H3**-e atsetüleeritud lüsiin (**K**) positsioonis **27**

H4 – histoon H4

HAT – histooni atsetüültransferaas

HDAC – *histone deacetylase* (histooni deatsetülaasid)

HDM – histooni demetülaasid

HGB – hügromütsiin-B

HHO1 – pärmi histoon H1

HIS – histidiin

HML – *homothallic mating left* (vasakpoolne homotalliline lookus)

HMR – *homothallic mating right* (parempoolne homotalliline lookus)

HMT – histooni metüültransferaasid

K – lüsiin

kDa – kilodalton

LiOAc – liitiumatsetaat

MAT – *mating type locus* (paardumistüübi lookus)

NAT – *nourseothricin* N-atsetüültransferaas

N-terminaalne / N-terminus – amino-terminaalne

NuA3 – *nucleosomal acetyltransferase of histone H3* (histooni H3 atsetüültransferaas)

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

PDB – **P**rotein **D**ata **B**ank (proteiini andmebaas)

PIC – *transcription preinitiation complex* (transkriptsiooni preinitsiatsioonikompleks)

PVDF – **p**oly**v**inylidene **d**ifluoride

R – arginiin

RCF – *relative centrifugal force* (suhteline tsentrifugaaljõud)

RPM – revolutions **p**er **m**inute (pöördeid minutis)

S – seriin

SAS – *something about silencing* (midagi vaigistamisest)

SDS – **s**odium **d**odecyl **s**ulfate (naatriumdodetsüülsulfaat)

Sir3 – *silent information regulator 3* (valgukompleks mis on seotud transkriptsioonilise vaigistamise reguleerimisega)

SWI/SNF – **SW**itch/**s**ucrose **n**onfermentable **c**omplex (kromatiini remodelleeriv kompleks)

SWR1 – **SW**I2/**SNF**2-**R**elated **1** (kromatiini remodelleeriv kompleks)

T – treoniin

Taq – **T**hermus **a**quaticus

TBS – **T**ris-**b**uffered **s**aline (Tris-iga puhverdatud soolalahus)

TBST – **T**ris-**b**uffered **s**aline with **T**ween (Tris-iga puhverdatud soolalahus koos Tween'iga)

TEMED – **t**etrametüületüleendiamiin

TFIID – *transcription factor II D* (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor D)

TFIIF – *transcription factor II F* (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor F)

WT – **w**ild **t**ype (metsiktüüpi)

YEATS – **Y**af9, **E**NL, **A**F9, **T**af14, **S**as5 (valgudomeen, nimetatud valkude järgi, kus see esimesena tuvastati)

YEATS2 - **YEATS** domain-containing **2** (YEATS-domeeni omav valk)

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

SISSEJUHATUS

Nii ruumi kaalutlustel, kui ka transkriptsiooni reguleerimiseks, pakitakse rakus DNA molekul kokku kõrgemat järku struktuuriks – kromatiiniks. Selline DNA kokkupakkimine leiab aset ainult eukarüootsetes rakkudes ja prokarüootides kromatiini ei esine. Mitoosi ajal on kromatiin tugevalt kondenseerunud ja moodustuvad kromosoomid. Interfaasi ajal on kromatiin rakutuumas dekondenseerunud kujul. Interfaasi kromatiinis esineb kahte sorti piirkondi: lõdvemalt pakitud transkriptsiooniliselt aktiivne eukromatiini piirkond ning tihedalt pakitud transkriptsiooniliselt vaigistatud heterokromatiini piirkond.

Nukleosoomid on DNA ja histoonivalkude kompleksid, kus kaheksast histoonist koosneva oktameerse südamiku ümber on keeratud DNA. Histoonidel on amino-terminaalsed (N-terminaalsed) mittestruktuursed „sabad“, mis ulatuvad nukleosoomist välja ja on histoone modifitseerivatele kompleksidele kättesaadavad nukleosoomi pinnalt. Histooni „sabade“ modifitseerimise kaudu saab kontrollida kromatiini avatust ja suletust ning selle abil reguleerida transkriptsiooni.

Histooni „sabadega“ seonduvatel valkudel on olemas domeenid, mis tunnevad ära spetsiifilist histooni „sabade“ modifitseerimismustrit. Üheks selliseks domeeniks on YEATS-domeen, nimetatud valkude järgi, kust see kõige esimesena avastati Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5. Nendest kolm, Yaf9, Taf14 ja Sas5, esinevad ka pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*. Antud töö keskendub valgu Yaf9 YEATS-domeenile, mis on seotud transkriptsiooni reguleerimisega, kuid mille täpne funktsioon ja töömehhanismide uurimine on olnud raskendatud, kuna YEATS-domeeni eemaldamisel muutub Yaf9 valk ebastabiilseks ja seda ei ekspresseerita enam normaalsel tasemel (Zhang *et al.*, 2004).

Käesoleva töö üldeesmärgiks oli konstrueerida *S. cerevisiae* tüved, kus Yaf9 valgu YEATS-domeen oleks vahetatud ära valgu Taf14 või valgu Sas5 YEATS-domeeniga ja tuvastada, kas pärm on võimeline sellist hübriidset valku ka ekspresseerima. Uurimaks, kuidas selline hübriidne valk rakusiseseid protsesse võib mõjutada, aitaks paremini mõista Yaf9 YEATS-domeeni funktsiooni. Töö kirjanduse osas antakse ülevaade kromatiinist, histoonide modifitseerimisest, YEATS-domeenidega pärmivalkudest ning täpsemalt ka Yaf9 valgust. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse vahetatud YEATS-domeeniga Yaf9 valgu ekspresseeriva *S. cerevisiae* mudelsüsteemi loomist.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mudelorganism *Saccharomyces cerevisiae*

Pärmseened on eukarüootsed mikroorganismid, mis kuuluvad seeneriiki. Pärmes on olemas üle 2300 liigi ja üheks neist on laborites laialdaselt mudelorganismina kasutatav *Saccharomyces cerevisiae* ehk pagaripärm (The.Yeasts, 2022).

Kuna mitmete organismide uurimine on sageli nii praktilistel, kui ka eetilistel põhjustel raskendatud, kasutatakse teaduses sellistel puhkudel mudelorganisme, mis omavad sarnaseid omadusi, kuid mida on lihtsam uurida. Mudelorganisme võib leida kogu fülogeneetilise puu ulatuses, bakteritest imetajateni, lisaks veel ka taimede hulgast (Müller ja Grossniklaus, 2010).

Erinevatel mudelorganismidel on erinevad eelised ja puudused. Üldiselt on heal mudelorganismil lühike elutsükkel, tal ei tohiks olla väga suuri nõudmisi toidu suhtes ja teda peaks olema kerge nii kasvatada, kui ka elus hoida. Näiteks kui võrrelda pagaripärmi ja laborihiire *Mus musculus* kasvutingimusi, siis pagaripärmi puhul on need üsna tagasihoidlikud, sest vajavad kasvamiseks ainult suhkrurikast söödet ja kindlat temperatuuri ning pH vahemikku (Salari ja Salari, 2007).

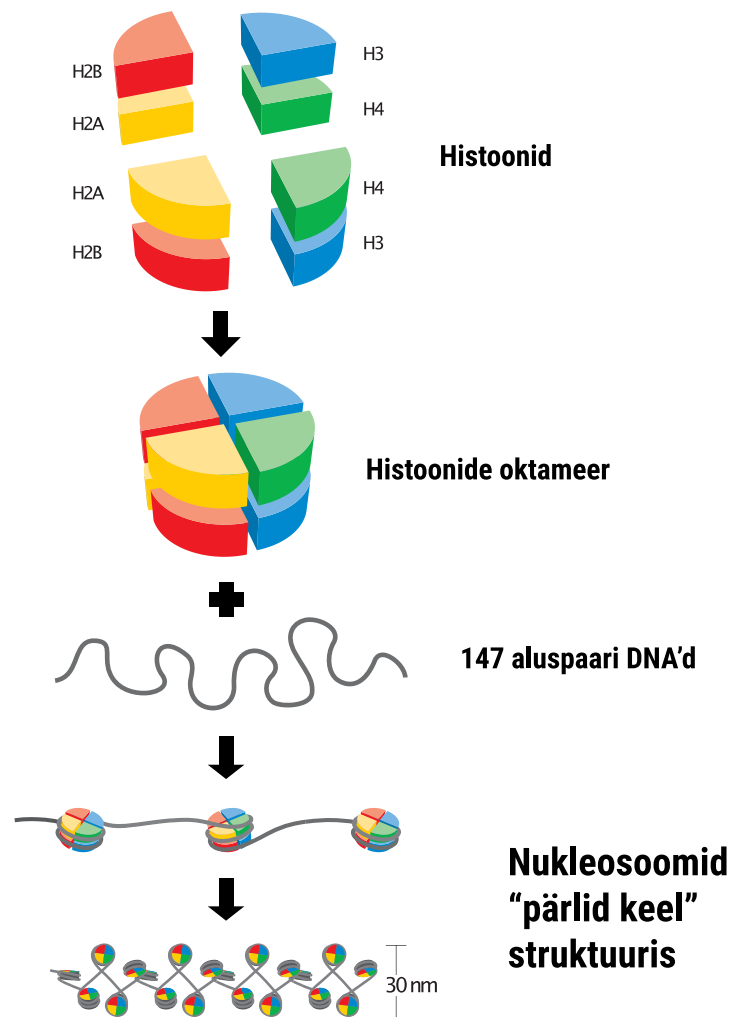
1990 aastate keskel sekveneeriti *Saccharomyces cerevisiae* genoom, mis oli ka kõige esimene täies mahus sekveneeritud eukarüootne genoom (Goffeau *et al.*, 1996). Kuigi inimese genoom on võrreldes pärmi genoomiga sadu kordi suurem (Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Goffeau *et al.*, 1996) on neil ka palju sarnasusi. Näiteks pärmi ca 6000 geenist on ligi 2700 geeni ortoloogsed inimese geenidega (Goffeau *et al.*, 1996; Remm *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2020). Lisaks on inimesel ja pärmil rakutasemel palju sarnaseid konserveerunud mehhanisme nagu autofaagia, sarnased valkude transpordi-, pakkimis-, sekreteerimis- ja degradeerimisviisid (Mizushima *et al.*, 2002; Dunphy *et al.*, 1986; Winderickx *et al.*, 2008; Brennwald *et al.*, 2007). Pärmi on kerge geneetiliselt muundada ja tänu kiirele elutsüklile saab ka katsete tulemusi kiiresti kontrollida.

1.2 Kromatiin

Juba 19. sajandi lõpul uuris Saksa teadlane Walther Flemming rakkude mitoosi. Raku tuumades nägi ta kergesti värvuvaid niidi taolisi osakesi ja nimetas need ajutiselt, kuni

tuvastatakse aine täpne keemiline iseloom, kromatiiniks (Deichmann, 2015). Tänapäeval nimetatakse Flemmingu nähtud niidikesi kromosoomideks ja struktuuri millest kromosoomid koosnevad kromatiiniks.

Kromatiini leidub ainult eukarüootsetes rakkudes ning selle peamiseks struktuurseks üksuseks on nukleosoomid (Kornberg, 1974). Nukleosoomid koosnevad aluselistest valkudest, histoonidest, ning nende ümber keerdunud umbes 145 kuni 147 aluspaari pikkusest DNA kaksikahelast (Luger *et al* 1997). Nukleosoomide histoonidest oktameerne südamik koosneb neljast valgust (H2A, H2B, H3 ja H4), millest igaühte esineb kaks korda (kokku kaheksa valku) (Kornberg ja Lorch, 1999). Üks nukleosoom koosneb harilikult kahest H2A/H2B dimeerist ja ühest (H3)₂/(H4)₂ tetrameersest histoonist (joonis 1) (Kornberg ja Lorch, 1999). Lisaks on veel erinevaid nukleosoomi ühendav, linker-DNA-ga seotud histoon H1 (Fischle *et al.*, 2003).

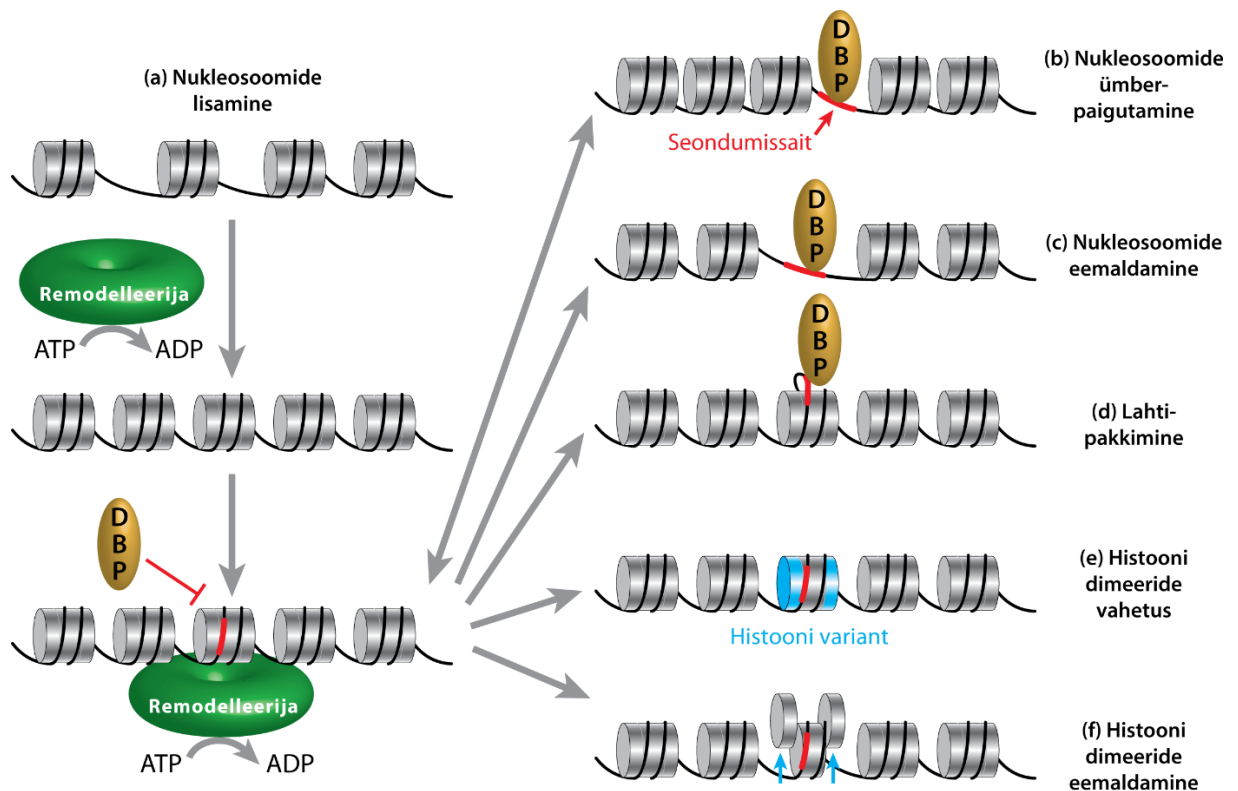


Joonis 1. Lihtsustatud kromatiini struktuur. Kaheksa histooni (2 x H2A, 2 x H2B, 2 x H3 ja 2 x H4) moodustavad oktameerse nukleosoomi südamiku. Histoonide oktameerile keerdub ümber 147 aluspaari DNA'd ja moodustub nukleosoom. Nukleosoomid kromatiinikiul moodustavad „pärlid keel“ struktuuri (Morgan, 2007, modifitseeritud).

Linker-DNA koos nukleosoomidega moodustab struktuuri, mida on iseloomustatud ka kui „pärlid keel“ (Wu *et al.*, 1986). Histoon H1 on võrreldes teiste histoonidega erinevate organismide vahel palju vähem konserveerunud (Harshman *et al.*, 2013). Näiteks on pagaripärmi histoon H1 valgul (HHO1) inimese H1 histooniga ainult 31% homoloogiat (Harshman *et al.*, 2013) ning erinevalt imetajarakkudest ei põhjusta *HHO1* geeni deleteerimine pärmis kasvudefekte ega suuri muutusi kromatiini struktuuris (Patterton *et al.*, 1998).

Kromatiini kokkupakituse aste on rakutsüklite vahel erinev (Ridgway *et al.*, 2002). Mitoosi ajal on kromatiin tugevalt kondenseerunud ja moodustuvad ka valgusmikroskoobi all nähtavad kromosoomid (Ridgway *et al.*, 2002). Interfaasi ajal on kromatiin rakutuumas decondenseerunud kujul ja jaotunud erinevatesse funktsionaalsetesse domeenidesse (Ridgway *et al.*, 2002).

Eukarüootse raku interfaasi kromatiinis esineb kahte sorti piirkondi, eukromatiin, mis on lõdvemalt pakitud ja kust toimub aktiivne geenide transkriptsioon, ning heterokromatiin, mis on tihedamalt pakitud ja millel puudub märkimisväärne transkriptsiooniline aktiivsus (Ridgway *et al.*, 2002). *S. cerevisiae*'s on kolm transkriptsiooniliselt vaigistatud heterokromatiinset piirkonda: telomeerid, ribosomaalse DNA (rDNA) tandeemsed järjestused ja vaigistatud paardumistüübi lookused (Gartenberg ja Smith, 2016). Transkriptsiooni reguleerimise üheks võimaluseks on kromatiini piirkondade avatuse ja suletuse kontrollimine, mis toimub erinevate histoonikompleksite modifikatsioonide abil, näiteks histooni „sabadele“ atsetüülgruppide lisamise (avab) või eemaldamisega (sulgeb) (Allfrey *et al.*, 1964). Histoonide modifikatsioone tunnevad ära kromatiini remodelleerivad kompleksid, mille abil reguleeritakse erinevate meetodite abil DNA kättesaadavust näiteks nukleosoomide lisamise, liigutamise ja eemaldamisega või nukleosoomide koostises olevate histoonide väljavahetamisega erinevate histooni variantide vastu (joonis 2) (Clapier *et al.*, 2009).



Joonis 2. Kromatiini remodelleerimise viisid. Kromatiini remodelleerijad (roheline) saavad muuta kromatiini struktuuri kasutades erinevaid meetodeid: (a) nukleosoomide lisamine, mille käigus paigutatakse juba deponeeritud nukleosoom ümber, et nende vahele mahuks uus nukleosoom. (b, c, d) Seondumiskoha (punane) paljastamine, et DNA-ga seonduv valk (DBP) saaks seondumiskohale ligi. (e) Nukleosoomi alternatiivse koosseisu tekitamine histoonide väljavahetamise kaudu või (f) histoonide eemaldamisega (Clapier *et al.*, 2009, modifitseeritud).

1.3 Histoonid

Histoonid on valgud, mis seonduvad DNA-ga ja osalevad selle kokkupakkimises ja paigutuses tuumas. Lisaks reguleerivad histoonid geeniekspressiooni ja epigeneetilise info talletamist (Luger *et al.*, 1997; Martire ja Banaszynski, 2020). Kuna prokarüootsetel rakkudel puudub kromatiin ja sellega seoses ka histoonid, esinevad viimased ainult eukarüootsetes rakkudes (Kornberg ja Lorch, 1999).

Kuigi histoonid on eri organismide lõikes ühed kõige väiksema struktuurse varieeruvusega valgud (Kornberg ja Lorch, 1999), on lisaks neljale põhilisele histoonile – H2A, H2B, H3 ja H4 – olemas ka nende mitmeid variatsioone (Talbert *et al.*, 2012). Histoonid H2A, H2B, H3 ja H4 lisatakse DNA-le replikatsiooni käigus, histoonide erinevaid variatsioone aga rakufaasides, mis ei pruugi olla replikatsiooniga seotud (Ahmad ja Henikoff, 2002). Näiteks arvatakse, et pärmis leiduva histooni H2A variatsioon Htz1 (H2A.Z) täidab mitmeid erinevaid funktsioone, nagu

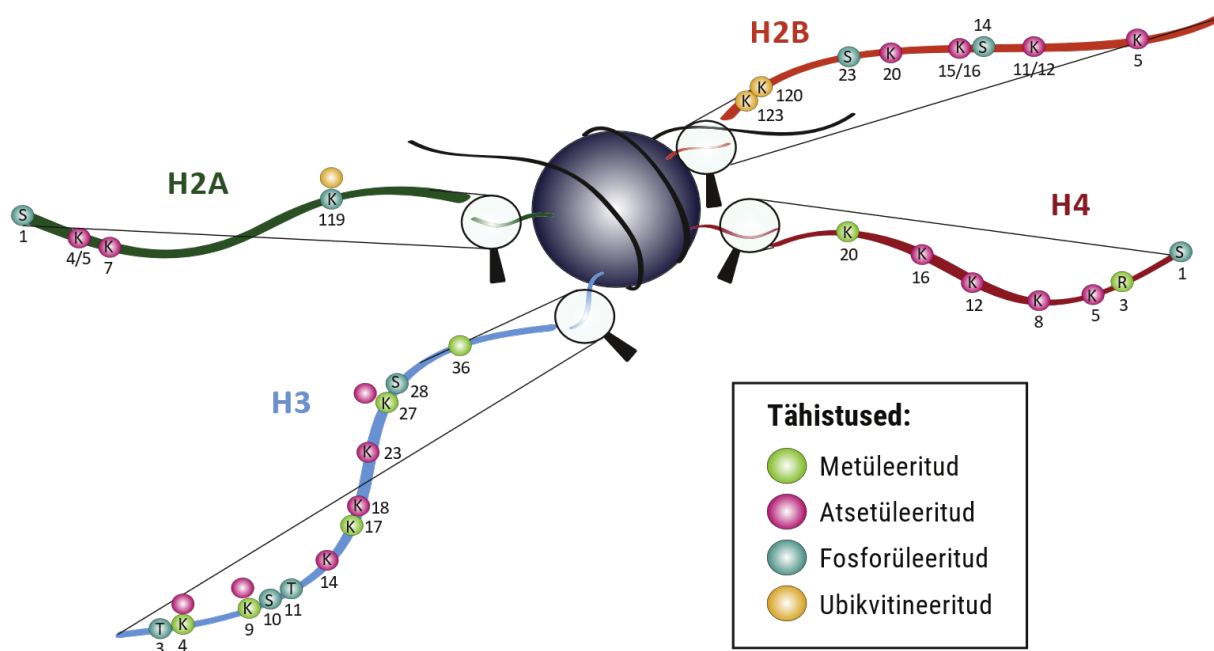
kromosoomi metabolism ja transkriptsiooni regulatsioon, mille üheks mehhanismiks on Htz1 sisaldavate histoonide deponeerimine repressseeritud promootoritele, mis aktiveeruvad, kui sealt Htz1 eemaldub (Zhang *et al.*, 2005). Lisaks on mittefunktsionaalse *htz1* geeniga mutandid tundlikumad erinevatele DNA-d kahjustavatele ainetele, mis viitab asjaolule, et Htz1 valgul on ka roll DNA parandamises (Zhang *et al.*, 2005). Pärmis leiduv histoon H3 variatsioon Cse4 (inimrakkudes, tsentromeeri proteiin A (*CENP-A*)), asendab pärmi kromatiini lühikeses tsentromeeri piirkonnas (~125 aluspaari) histooni H3 ja on raku jagunemisel vajalik õigeks kinetohoori assambleerumiseks ja kromosoomide võrdseks jagunemiseks (Furuyama ja Biggins, 2007).

Histoonide N-terminaalses osas asuvad „sabad“, mis ulatuvad nukleosoomist välja selliselt, et on erinevatele histoonide modifitseerivatele kompleksidele kättesaadavad nukleosoomi pinnalt (Lawrence *et al.*, 2016). Selline paigutus võimaldab „sabade“ modifitseerimist, mis toimub erinevate keemiliste rühmade kovalentse seondumisega „saba“ teatud positsioonides asuvate aminohapetega (Lawrence *et al.*, 2016). Modifitseeritud „sabade“ kaudu, saavad histoonid omandada uusi funktsionaalsusi (Lawrence *et al.*, 2016).

1.4 Histoonide modifitseerimine

Histoonid reguleerivad geeniekspressiooni DNA lahti (eukromatiin) ja kokku (heterokromatiin) pakkimise või DNA väänamise kaudu, muutes sellega DNA kättesaadavust transkriptsioonifaktoritele (Lawrence *et al.*, 2016). Kromatiini avatust ja seeläbi ka geeniekspressiooni reguleeritakse histooni „sabadel“ olevate aminohappejääkide atsetüleerimise, metüleerimise, fosforüleerimise, ubikvitineerimise, sumoüleerimise, ADP-ribosüleerimise ja deamineerimisega (joonis 3) – need muudavad DNA kättesaadavust transkriptsioonifaktoritele ja reguleerivad ligipääsu kromatiinistruktuuri modifitseerivatele ensüümidele (Lawrence *et al.*, 2016).

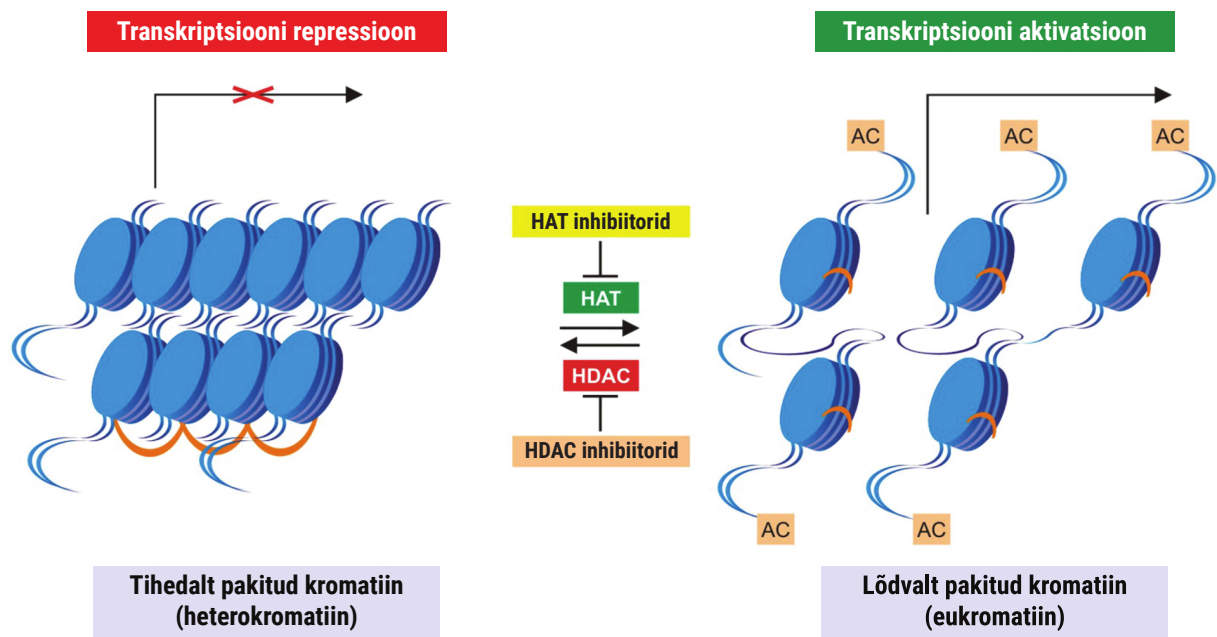
Histooni „sabade“ modifikatsioonide abil värvatakse ka efektorvalke, mis aktiveerivad allavoolu signalseerimisradasid (Lawrence *et al.*, 2016). Enim uuritumaks histoonide post-translatsiooniliseks modifikatsioonideks on kovalentne histooni „sabade“ lüsiinijääkide atsetüleerimine ja metüleerimine (Millar ja Grunstein, 2006). Nii histoonide atsetüleerimine, kui ka metüleerimine on pööratavad protsessid (Millar ja Grunstein, 2006).



Joonis 3. Histooni „sabade“ modifitseerimine. Histooni oktaamerist ulatuvad välja histoonide „sabad“. Aminohapete positsioonid on märgistatud numbritega ja aminohapped tähtedega (K = lüsiin, R = arginiin, S = seriin, T = treoniin) (Lawrence *et al.*, 2016, modifitseeritud).

Histoonide hüperatsetüleerimist, ehk paljude atsetüülrühmade liitmist histooni „sabadele“, seostatakse transkriptsioonilise aktiivsuse tõusuga ja hüpoatsetüleerimist, ehk atsetüülrühmade eemaldamist „sabadelt“, transkriptsioonilise aktiivsuse langusega (joonis 4) (Grunstein *et al.*, 1997).

Komplekse, mis histoone atsetüleerivad ja metüleerivad, nimetatakse vastavalt histooni atsetüültransferaasideks (HAT) ja metüültransferaasideks (HMT), komplekse mis histoonidelt atsetüül- ja metüülrühmi eemaldavad, nimetatakse vastavalt deatsetülaasideks (HDAC) ja demetülaasideks (HDM), need ensüümid on eukarüootsete organismide seas väga konserveerunud ja neid leidub näiteks nii pärmidel kui ka inimestel (Gregoretti *et al.*, 2004; Millar ja Grunstein, 2006; Zhou ja Ma, 2008; Wang *et al.*, 2009; Mersman *et al.*, 2012).



Joonis 4. Histoonide atsetüleerimise ja deatsetüleerimise mehhanism. HAT-id (histooni atsetüültransferaasid) lisavad nukleosoomidest välja ulatuvate histooni „sabade“ külge atsetüülrühmasid (AC). HDAC-id (histooni deatsetüültransferaasid) eemaldavad histooni sabade küljest atsetüülrühmasid. Kromatiin on pakitud tihedalt ja transkriptsioon on repressseeritud, kui „sabadel“ puuduvad atsetüülrühmad. Atsetüülrühmade olemasolul histooni sabadel, muutub kromatiin selle kohapealt lokaalselt avatumaks ja tõuseb ka transkriptsiooni tase selles piirkonnas olevalt DNA-lt. HAT-ide aktiivsust inhibeervad HAT-ide inhibiitorid ja HDAC-ide aktiivsust inhibeervad HDAC-ide inhibiitorid (Lourenço de Freitas *et al.*, 2021, modifitseeritud).

1.5 YEATS-domeen

Kromatiini saab väga erinevat moodi modifitseerida ja teatud valkudel on olemas domeenid, mis spetsiifilist modifitseerimismustrit ära tunnevad. Üheks selliseks domeeniks on YEATS-domeen. YEATS-domeen on nimetatud akronüümina valkude järgi, kust seda kõige esimesena leiti ja mille koosseisu ta kuulub (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, and Sas5), millest Yaf9, Taf14 ja Sas5 leidub *Saccharomyces cerevisiae*s ning ENL ja AF9 inimeses (Schulze *et al.*, 2009). Hiljem leiti, et YEATS-domeen on väga konserveerunud ja seda leidub rohkem kui 100 valgus üle 50 organismi seas (tabel 1) (Schulze *et al.*, 2009). *S. cerevisiae*s leiduvad YEATS-domeeniga valgud on seotud kromatiini modelleerimise, histoonide modifitseerimise ja transkriptsiooni reguleerimisega (Schulze *et al.*, 2009).

YEATS-domeeniga valkude puhul on leitud, et lisaks atsetüleeritud histoonidega seondumisele, võivad näiteks YEATS2 (YEATS-domeeni omav valk) ja Taf14 valk seonduda ka krotonüleeritud histoonidega (Li *et al.*, 2017). Krotonüleerimine on hiljuti avastatud uus

posttranslatsiooniline histooni „sabade“ lüsiinide modifikatsioon (Tan *et al.*, 2011). Krotoüleerimise abil mõjutatakse geeniekspressiooni, DNA replikatsiooni, transkriptsiooni ja rakkude diferentseerumist (Jiang *et al.*, 2021).

Tabel 1. Valik erinevates organismidest leiduvatest YEATS-domeeni omavatest valkudest. Tabelis on ära toodud ka kompleks kuhu valk kuulub ja kompleksi funktsioon (Schulze *et al.*, 2009, modifitseeritud).

Valk	Organism	Kompleks	Funktsioon
Yaf9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SWR1-Com	Histooni Htz1 depositsioon
		NuA4	Histoonide H4, H2A ja Htz1 atsetüleerimine
Taf14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SWI/SNF	Kromatiini remodelleerimine
		INO80	Kromatiini remodelleerimine
		RSC	Kromatiini remodelleerimine
		NuA3	Histooni H3 atsetüleerimine
		TFIID	Üldine transkriptsioonifaktor
		TFIIF	Üldine transkriptsioonifaktor
Sas5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SAS	Histooni sabade (H4K16, H3K14) atsetüleerimine
GAS41	<i>Homo sapiens</i>	SRCAP	Histooni Htz1 depositsioon
		TIP60	Histooni H4 atsetüleerimine
ENL	<i>Homo sapiens</i>	EBAFa	Kromatiini remodelleerimine
		EBAFb	Kromatiini remodelleerimine
AF9	<i>Homo sapiens</i>	Dot1a-AF9	Histooni saba (H4K79) metüleerimine
D12	<i>Drosophila melanogaster</i>	ATAC	Histoonide atsetüleerimine ja kromatiini remodelleerimine

1.6 Yaf9

Yaf9 on 226 aminohappe pikkune ja 25,9 kilodaltoni (kDa) suurune pagaripärmi eluks mitte-hädavajalik valk (The *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database, 2022). Yaf9 valk kuulub pärmi *Saccharomyces cerevisiae* kahe kompleksi *SWI2/SNF2-Related 1 (SWR1)* ja histoonide H4 ja H2A atsetüültransferaasi (*NuA4*) koosseisu. Need kompleksid on vajalikud normaalselt toimivaks geeniekspressiooniks, DNA metabolismiks, DNA parandamiseks ja histoonide väljavahetamiseks (Lawrence *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2004; Chittuluru *et al.*, 2011). *SWR1* kompleks vahetab histoonide H2A/H2B dimeeri välja histooni Htz1/H2B dimeeri vastu, kuid väljavahetusprotsessi mehhanismist ei ole veel täielikult aru saadud (Willhoft *et al.*, 2018). Spetsiifiliste histoonide sabade lüsiine atsetüleerivad kindlad HAT-id, *NuA4* on pärmi HAT, mis nukleosoomiga seondumisel atsetüleerib histoonide H4 ja H2A sabasid (Chittuluru *et al.*, 2011). *NuA4* koosneb 13 unikaalsest valgust, millest 3 viivad läbi HAT-iga seonduvaid funktsionaalsusi ja ülejäänud 9, mille hulgas on ka Yaf9, aitavad *NuA4*-l jõuda vajalikesse

kohtadesse, et viia läbi DNA parandamist, transkriptsiooni initsiatsiooni ja RNA elongatsiooni (Chittuluru *et al.*, 2011).

Nii *SWR1*, kui ka *NuA4* puhul, on Yaf9 täpne funktsionaalne roll kompleksis veel ebaselge (Zhang *et al.*, 2004), kuid on teada, et mõlemale kompleksile on oluline Yaf9 võime seonduda histooni H3 „saba“ atsetüleeritud aminohappejääkidega (Klein *et al.*, 2018). Seandumine toimub läbi YEATS-domeeni ja eelkõige on soovitud seandumine positsioonis H3K27ac (histoon H3-e atsetüleeritud lüsiin positsioonis 27) (Klein *et al.*, 2018).

Mutandid, millel Yaf9 puudub, on tundlikumad DNA-d kahjustavatele ainetele, madalale temperatuurile ja kofeiinile (tabel 2) (Zhang *et al.*, 2004). Lisaks on ilma Yaf9 valguta mutantidel väiksem transkriptsiooniline aktiivsus telomeeride lähedal, mis korreleerub samas piirkonnas vähendatud H4 histoonide atsetüleerimisega ja väiksema Htz1/H2B dimeeride olemasoluga (Zhang *et al.*, 2004). *In vitro* tehtud katsetes *NuA4* kompleksiga, millel puudub Yaf9 valk, säilib histoonide atsetüleerimisvõime, mis viitab asjaolule, et Yaf9 tähtsus *NuA4* kompleksis on regulatoorne või oluline *NuA4* kompleksi lokaliseerimiseks kindlatesse kromatiini piirkondadesse (Zhang *et al.*, 2004). Lisaks suureneb mutantsetes, Yaf9 valku mitte ekspresseerivates pärmitüvedes, transkriptsiooni vaigistava *silent information regulator 3* (*Sir3*) valgu hulk telomeeride läheduses (Zhang *et al.*, 2004).

S. cerevisiae tüvedes, kus Yaf9 YEATS-domeen on deleteeritud, ei ekspresseeru Yaf9 valk enam stabiilsena ja on *immunoblot* analüüsiga vaevu detekteeritav (Zhang *et al.*, 2004), see asjaolu muudab keeruliseks ka Yaf9 YEATS-domeeni funktsiooni uurimise.

Ka inimestel on olemas Yaf9-ga ortoloogne valk – AF9 , mille mittesihipärane toimimine on seotud ägedate leukeemiahaigustega (Zhang *et al.*, 2004).

Tabel 2. *S. cerevisiae* tüvedes ekspresseerunud fenotüübid, kui neil oli deleteeritud (Δ) vastavalt kas Yaf9, Taf14 või Sas5 valgu geen või nende kombinatsioon. Tabeli legend: (+) WT (metsiktüübi) kiirusega kasv, (+/-) aeglane kasv, (-/+) väga aeglane kasv, (-) kasv puudub (Zhang *et al.*, 2004, modifitseeritud).

Genotüüp	Kasv järgnevatel tingimustel:					
	28 °C	15 °C	5 mM kofeiin	50 mM hüdroksüürea	UV kiirgus	0.03% metüül metaansulfonaat
WT (YBC1665)	+	+	+	+	+	+
yaf9 Δ	+/-	-	-/+	-/+	-	-
sas5 Δ	+	+	+	+	+	+
taf14 Δ	-/+ kuni +/-	+/-	-/+	- kuni -/+	-	-
yaf9 Δ taf14 Δ sas5 Δ	← elujõuetu →					

1.7 Taf14

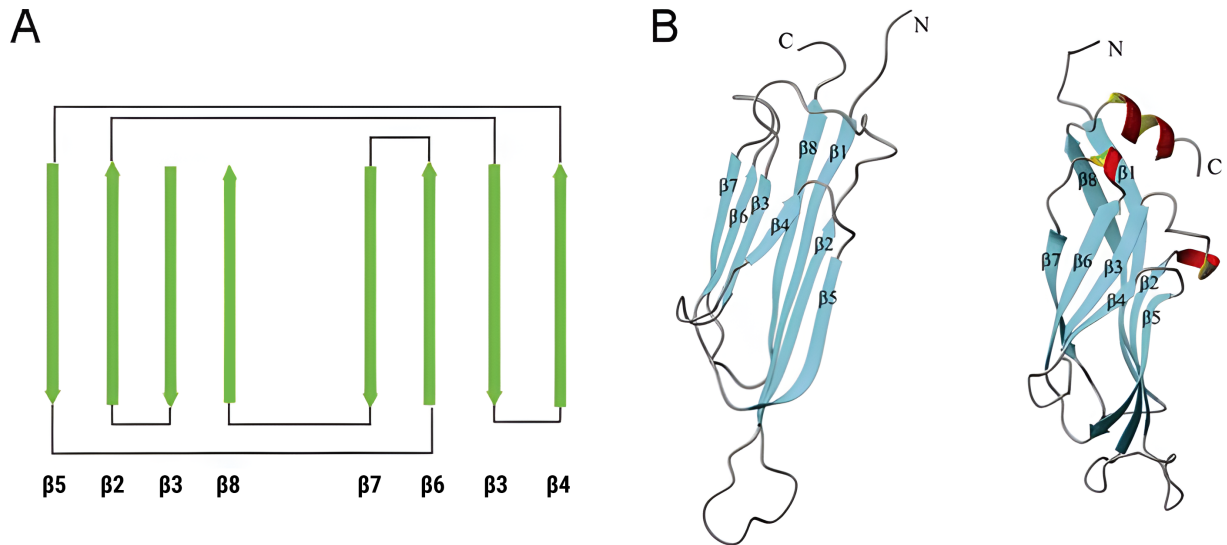
Teiseks YEATS-domeeniga valguks pagaripärmis on 244 aminohappe pikkune ja 30 kDa suurune valk Taf14 (varasemalt nimetatud ka ANC1 , TafII30 , SWP29 , TAF30 , TFG3) (*The Saccharomyces Genome Database*, 2022). Taf14 kuulub mitme erineva kompleksi koosseisu, näiteks: RNA polümeraas II transkriptsioonifaktorite D (*TFIID*) ja F (*TFIIF*), kromatiini remodelleerivate komplekside INO80 ja *SWI/SNF* ning histooni H3 atsetültransferaas (*NuA3*). Taf14 valgul on ka oluline roll RNA polümeraas II transkriptsiooni initsiatsioonil (Henry *et al.*, 1994; Cairns *et al.*, 1996; John *et al.*, 2000; Kabani *et al.*, 2005; Tora, 2002; Feigerle ja Weil, 2016).

Taf14 YEATS-domeeni peamine ülesanne on stabiliseerida transkriptsiooni pre-initsiatsioonikompleksi (*PIC*) (Peil *et al.*, 2020). Lisaks on leitud ka, et Taf14 suudab YEATS-domeeni abil seonduda histoonidega, mille lüsiinid on posttranslatsiooniliselt krotonüleeritud (Andrews *et al.*, 2016). Taf14 roll krotonüleeritud histoonide ära tundmises on seotud rakkude metabolismi reguleerimisega, kus mitootilise jagunemise või toitainete vähesuse korral vaigistatakse histoonide krotonüleerimisega raku kasvuks vajalikud energianõudlikud geenid (Gowans *et al.*, 2019).

Kui *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes on deleteeritud kõik YEATS-domeeniga valke kodeerivad geenid (*YAF9*, *TAF14*, *SAS5*), siis need rakud ei ole enam eluvõimelised (Zhang *et al.* 2004). Rakkudel, mida on modifitseeritud selliselt, et Yaf9 ja Sas5 valku kodeerivad geenid on deleteeritud ning Taf14 valku kodeeriv geen on muteeritud nii, et N-terminaalses osas asuv YEATS-domeen on eemaldatud ja ekspresseerub ainult karboksü-terminaalne (C-terminaalne) osa valgust, siis sellised mutandid on eluvõimelised (Peil *et al.*, 2020). Stressitingimustes, kus söötmesse on lisatud formamiidi või hüdroksüureat, kasvavad YEATS-domeenita Taf14 mutandid isegi paremini kui YEATS-domeeniga rakud, mis viitab asjaolule, et stressi tingimustes pärsib Taf14 YEATS-domeen rakkude kasvu ja võib olla seotud ka DNA parandamisega ning rakutsükli reguleerimisega (formamiid ja hüdroksükarbamiid mõjutavad just neid protsesse) (Zhang *et al.*, 2011).

Taf14 ja Yaf9 YEATS-domeenid on üldpildis sarnased ja mõlema valgu YEATS-domeenide alusstruktuur moodustub kaheksast β -lehest ning on analoogse topoloogiaga (Joonis 5) (Zhang *et al.*, 2011). Taf14 ja Yaf9 YEATS-domeenid erinevad aga näiteks selle poolest, et mõlema valgu YEATS-domeenide β -lehed koosnevad erinevast arvust aminohappejääkidest (Taf14

– 123 ja Yaf9 – 164) ning lisaks on Taf-14 YEATS-domeenil 2 α -heeliksit vähem (Zhang *et al.*, 2011). Taf14 ja Yaf9 YEATS-domeenide valgujärjestuste identsus on 18% ja sarnasus 40% (Zhang *et al.*, 2011).



Joonis 5. Taf14 ja Yaf9 YEATS-domeenide struktuuri võrdlus. (A) Taf14 ja Yaf9 YEATS valkude topoloogia diagramm, mõlema valgu YEATS-domeenid sisaldavad kaheksat sarnaselt paigutunud β -lehte. (B) Vasakul Taf14 YEATS-domeeni ruumiline struktuur (proteiini andmebaasi (PDB) kood: 2L7E) ja paremal Yaf9 YEATS-domeeni ruumiline struktuur (PDB kood: 3FK3) (Protein Data Bank, 2022; Zhang *et al.*, 2011, modifitseeritud).

1.8 Sas5

Kolmandaks YEATS-domeeniga valguks pagaripärmis on 248 aminohappe pikkune ja 29 kDa suurune valk Sas5 (*The Saccharomyces Genome Database*, 2022). Sas5 valk kuulub *something about silencing* (SAS) kompleksi, mis atsetüleerib histooni H4 lüsiini 16 ja histooni H3 lüsiini 14, ning on näidatud, et Sas5 valgul on selle kompleksi aktiivsusele stimuleeriv roll (Sutton *et al.*, 2003).

Valk Sas5 toimib ka koos valkudega Sas2 ja Sas4 transkriptsiooni vaigistavalt vasakpoolsele homotallilisele lookusele (*HML*) ja telomeeride piirkondadale ning vaigistamist alla suruvalt parempoolsele homotallilisele lookusele (*HMR*) (Xu *et al.*, 1999). *HML*, *HMR* ja lisaks ka paardumistüübi (*MAT*) lookused on seotud haploidse pärimi paardumistüübi vahetusega (Strathern *et al.*, 1982; Haber, 2012).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Varasematest katsetest on teada, et kui Yaf9 valgul puudub YEATS-domeen, siis selline mutantne Yaf9 valk ei ole enam stabiilne ja on rakkudes ainult vaevu detekteeritaval tasemel ekspresseeritud (Zhang *et al.*, 2004). See asjaolu muudab Yaf9 valgu YEATS-domeeni uurimise keeruliseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli luua mudelsüsteem, mida saaks kasutada Yaf9 YEATS-domeeni edasisel uurimisel. Selle jaoks tuli:

1. Lisada Yaf9 valku kodeeriva järjestuse lõppu Flag-epitooopi kodeeriv järjestus, et Yaf9 valgu ekspressiooni oleks võimalik *Western blot* meetodiga detekteerida.
2. Vahetada Yaf9 valgu YEATS-domeeni kodeeriv järjestus kas Taf14 valgu või Sas5 valgu YEATS-domeeni kodeeriva järjestuse vastu.
3. Kontrollida saadud hübriidsete valkude ekspressiooni *Western blot* meetodil.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud tüved

Töös kasutatud tüved on loodud *S. cerevisiae* tüve W303 baasil. Tüvede genotüübid ja päritolu on kirjas tabelis 3.

Tüvede AKY2506 ja AKY2507 valmistamiseks lisati tüve AKY202 geeni *YAF9* kodeeriva ala lõppu *3xFLAG-tag*'i ja markergeeni kodeeriv järjestus. Tüve AKY2506 jaoks kasutati markergeeni *natMX6* (antud töös tähistatud ka nimetusega NAT), tüve AKY2507 jaoks markergeeni *hghMX* (antud töös tähistatud ka nimetusega HGB). Tüvede AKY2506 ja AKY2507 kontrollimiseks *Western blot*'i analüüsil, kasutati positiivse kontrollina tüve 2497, millel asub Flag-epitooobi järjestus Yaf9 valgu N-terminuses.

Tüve AKY2507 põhjal konstrueeriti tüved AKY2520 ja AKY2521. Tüve AKY2520 Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriv ala on vahetud ära valgu Sas5 YEATS-domeeni kodeeriva alaga ning tüve AKY2521 puhul on toimunud vahetus valgu Taf14 YEATS-domeeni kodeeriva alaga.

Tabel 3. Kasutatud pärmitüvede genotüüp ja päritolu.

Tüvi	Detailid	Genotüüp	Päritolu
W303	Tüvi mille põhjal tehti tüvi AKY202.	<i>MAT A ura3 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1 100 lys2</i>	B. J. Thomas ja R. Rothstein, 1989
AKY202	Antud töö metsiktüüpi tüvi. Kasutati negatiivse kontrollina.	<i>W303, MAT A, hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX YCp50:HHT2-HHF2 (URA3)</i>	Jesper Svejstrup
AKY2497	Yaf9 N-terminusele lisatud <i>FLAG-tag</i> . Antud töös kasutati positiivse kontrollina.	<i>W303, MAT A, yaf9::TRP1, ade2::FLAG-Yaf9-ADE2; hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX YCp50:HHT2-HHF2 (URA3)</i>	Signe Värv
AKY2506	Yaf9 C-terminusele lisatud <i>3xFLAG-tag</i> .	<i>W303, MAT A, hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX YCp50:hht2-hhf2 (URA3) yaf9::yaf9-3xFlag-natMX6</i>	Valmis töö käigus tüve AKY202 baasil.
AKY2507	Yaf9 C-terminusele lisatud <i>3xFLAG-tag</i> .	<i>W303, MAT A, hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX YCp50:hht2-hhf2 (URA3) yaf9::yaf9-3xFlag-hghMX</i>	
AKY2520	Yaf9 N-terminus vahetatud Taf14 N-terminusega.	<i>W303, MAT A, hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX YCp50:hht2-hhf2 (URA3) yaf9::HIS3-taf14YEATS-yaf9-3xFlag::hghMX</i>	Valmis töö käigus tüve AKY2507 baasil.
AKY2521	Yaf9 N-terminus vahetatud Sas5 N-terminusega.	<i>W303, MAT A, hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX YCp50:hht2-hhf2 (URA3) yaf9::HIS3-sas5YEATS-yaf9 - 3xFlag::hghMX</i>	

2.2.2 Kasutatud söötmed

Rikastussöötmena kasutati *YPD* (*yeast extract, peptone, dextrose*) tard- ja vedelsöötmeid. Selektiivsöötmetena kasutati *YPD* söötmeid, kuhu oli lisatud antibiootikume, +NAT (*nourseothricin*, 100 µg/ml), +HGB (hügromütsiin-B, 100 µg/ml) ning minimaalsöödet, kus puudus pärmirakkude kasvuks hädavajalik histidiin (-HIS selektiivsööde). Söötmete koostised on ära toodud tabelis 4.

Tabel 4. Kasutatud söötmete koostised ja kasutuskohad

Sööde	Koostisosad
YPD tardsööde	Agar 20 g/l; pulbrikujul pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi
YPD vedelsööde	Pulbrikujul pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi
+NAT tardsööde	<i>Nourseothricin</i> 100 µg/ml, agar 20 g/l; pulbrikujul pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi
+HGB tardsööde	Hügromütsiin-B 100 µg/ml, agar 20 g/l; pulbrikujul pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi
-HIS tardsööde	Agar 20 g/l; pulbrikujul pärmiekstrakt 10 g/l; glükoos 20 g/l; aminohapped: lüsiin 0,08 g/l, leutsiin 0,08 g/l, trüptofaan 0,08 g/l, uratsiil 0,2 g/l; vesi

2.2.3 Kasutatud plasmiidid

Yaf9 C-terminuse, Flag-epitoobi (*3xFLAG-tag*) ja markergeeniga (*natMX6* või *hghMX*) DNA lõikude sünteesimiseks kasutati plasmide 3xFlag-NatMX (*natMX6* markergeeniga lõikude jaoks) ja 3xFlag-HgB (*hghMX* markergeeniga lõikude jaoks). Taf14 ja Sas5 YEATS-domeenide ja *HIS3* markeriga DNA lõikude sünteesimiseks kasutati plasmide pRS413_Taf14 ja pRS413_Sas5. Kõik töös kasutatud plasmiidid on pärit Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi kollektsioonist.

2.2.4 Transformatsiooniks vajalike DNA fragmentide sünteesimine

3xFLAG-tag'i lisamiseks Yaf9 C-terminusse, tuli kõigepealt sünteesida DNA lõigud, mis sisaldaks Yaf9 C-terminusega homoloogset ala, 3xFLAG-tag'i, transkriptsiooni terminaatorala ja *natMX6* või *hghMX* markerit. Lõikude sünteesimiseks kasutati PCR-i meetodit. 50 µl PCR-i reaktsioonilahuse tegemiseks kasutati: 31 µl destilleeritud vett; 10 µl PCR-i puhvrit (5x *Thermo Scientific Phusion Green GC Buffer*); 5 µl dNTP segu (2mM 10x *Thermo Scientific dNTP Mix*); 2,5 µl praimereid (10 µmol/µl); 1,5 µl plasmidi (20 ng/µl); 0,5 µl polümeraasi (*Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µL)).

Flag-epitooipi kodeeriva järjestusega DNA fragmentide sünteesimiseks kasutati praimereid Yaf9_tag_F ja Yaf_9_tag_R ning plasmide 3xFlag-HgB (*hghMX* markergeeniga fragmendi jaoks) ja 3xFlag-NatMX (*natMX6* markergeeniga fragmendi jaoks). Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriva osa väljavahetamiseks vajaliku fragmendi sünteesimise jaoks kasutati praimereid pRS_yaf9_F, Taf14_YEATS_yaf9_R ja Sas5_YEATS_yaf9_R, ning plasmide pRS413_Taf14 ja pRS413_Sas5. Praimerite järjestused on ära toodud lisas 1.

PCR viidi läbi *SimpliAmp™ Thermal Cycler* masinaga. Reaktsiooni jaoks kasutati järgmist programmi: eeldenaturatsioon 1 min, 98 °C; 30 tsüklit teist etappi (denaturatsioon 10 sek, 98 °C; praimerite seondumine 20 sek, 59 °C; süntees 45 sek, 72 °C); järelsüntees 5 min, 72 °C.

2.2.5 Agaroos-geelelektroforees

PCR-i reaktsioonide produktidest kontrolliti 5 µl agaroos-geelelektroforeesil. Selleks valmistati 0,8-1%-line agaroosgeel, mille tegemiseks kasutati 1x TAE puhvrit (pH 8; 40 mM Tris; 20 mM atsetaat; 1 mM EDTA), vastav kogus agaroosi ja etiidiumbromiidi (0,5µg/ml).

2.2.6 Transformatsioon elektroporeerimise meetodil

Transformatsiooniks kasutatud PCR-i produktid sadestati. Selleks lisati PCR produktile esmalt 145 µl TE puhvrit (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA), 20 µl 3M NaAc, 1 µl glükokeeni (20 mg/ml), 600 µl 96%-list piiritust ning proove hoiti 30 minutit -20°C juures. Proove tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 15 min suhtelise tsentrifugaaljõu (*RCF*) 16100 juures, supernatant eemaldati ning sadet pesti 500 µl 70%-lise etanooliga. Seejärel tsentrifuugiti proove 10 min 16100 *RCF*, supernatant eemaldati ning sade lahustati 20 µl mQ vees. Transformeeritavaid pärmirakke

kasvatati üleöö (17h) loksutil (*New Brunswick Scientific Excella E25 Incubator Shaker Series*; 200 pööret minutis (*RPM*); 30 °C) 25 ml *YPD* vedelsöötmes. Pärmirakud koguti tsentrifuugides (*Sigma 4K15C*; 5 min; 850 *RCF*; 17 °C). Rakusade suspendeeriti 8,8 ml TE puhvris (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA) ning lisati 1 ml 1 M liitiumatsetaati (LiOAc). Lahust inkubeeriti 45 minutit loksutil (*New Brunswick Scientific Excella E25 Incubator Shaker Series*; 100 *RPM*; 30 °C), mille järel lisati 250 µl 1 M *DTT*-d (*dithiothreitol*) ja asetati tagasi loksutile (15 min, 100 *RPM*, 30 °C). Järgnevalt lisati rakususpensioonile 40 ml destilleeritud vett ja rakud koguti tsentrifuugides (5 min; 850 *RCF*; 17 °C). Rakusadet pesti kaks korda 50 ml jääkülma mQ veega ning tsentrifuugiti uuesti (5 min; 850 *RCF*; 17 °C). Seejärel suspendeeriti rakud 1 ml 1 M sorbitoolis, koguti tsentrifuugides (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*; 1 minut; 2300 *RCF*; 4 °C), sade suspendeeriti 50 µl 1 M sorbitoolis, lisati 10 µl lahust poreeritava DNA-ga ning segati segajal (*Vortex-Genie 2*; maksimum tugevus). Saadud lahus kanti 2 mm küveti, elektroporeerimine teostati poraatoriga *Bio-Rad Gene Pulser Xcell™* kasutades eelseadistatud programmi.

Peale poreerimist lisati rakususpensioonile 1 ml 1 M sorbitooli, rakud suspendeeriti ja asetati jääle. Rakud koguti tsentrifuugides lauatsentrifuugiga 3 minutit; 800 *RCF*; toatemperatuuril ning külvati kas *YPD* tassidele või –HIS selektiivtassile. *YPD* tassil tihedaks kasvanud rakud külvati järgmisel päeval tempelkülvi kasutades antibiootikumi sisaldavale selektiivtassile.

2.2.7 Kolooniade kontrollimine

Selektiivtassidel ülesse kasvanud kolooniatest eraldati DNA ning *YAF9* geenile tehtud modifikatsioone kontrolliti PCR meetodil. Selleks kanti steriilse puutikuga pärmikolooniast rakke 100 µl 1% *SDS* (naatriumdodetsüülsulfaat) + 0,2 M LiOAc lüüsilahusesse. Rakke inkubeeriti 15 minutit 70 °C-l. Seejärel lisati suspensioonile 300 µl 96%-list etanooli ja tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*; 3 min; 16100 *RCF*; 4 °C). Supernatant eemaldati, sadet pesti 70%-lise etanooliga ning korraldati tsentrifuugimist. Supernatant eemaldati ja sadet kuivatati 10 min; 40 °C-l. Seejärel lahustati sade 100 µl TE-s (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1 mM EDTA), segati segajal ja tsentrifuugiti (1 min; 16100 *RCF*; 4 °C). 1 µl lahust kanti PCR-i lahusesse.

Kolooniade kontrollimist tehti antud töös kahe etapi puhul. Kõigepealt, et tuvastada kas Yaf9 C-terminusele *3xFLAG-tag*'i ja markerite lisamine on õnnestunud, ning seejärel tuvastamiseks kas Yaf9 YEATS-domeeni vahetus Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni vastu on õnnestunud. *3xFLAG-tag*'i kontrollimiseks kasutati PCR-i.

10 µl PCR-i reaktsioonilahuse tegemiseks kasutati: 6,5 µl destilleeritud vett; 2 µl PCR-i puhvrit (5x FIREPol® Master Mix Ready to Load (*Thermus aquaticus* (Taq) polümeraas FIREPol®, MgCl₂, dNTP-d)); 1 µl Kolooniast eraldatud DNA-d; 0,5 µl praimereid (10 µmol/µl).

3xFLAG-tag'i lisamise kontrollimiseks kasutati praimereid Yaf9-tag-ctrl ja FBA1_ctrl_2. Yaf9 YEATS-domeeni vahetuse kontrollimiseks kasutati praimereid FBA1_ctrl_2, TAF14-C-term-CTRL ja Sas5_Cterm_ctrl. Praimerite järjestused on ära toodud lisas 1.

PCR viidi läbi *SimpliAmp™ Thermal Cycler* masinaga. Reaktsiooni jaoks kasutati järgmist programmi: eeldenaturatsioon 3 min, 95 °C; 30 tsüklit teist etappi (denaturatsioon 30 sek, 95 °C; praimerite seondumine 25 sek, 55 °C; süntees 1 min, 72 °C); järelsüntees 5 min, 72 °C.

2.2.8 Rakulüsaadi valmistamine Western blot'i jaoks

Rakulüsaadi valmistamiseks kasvatati rakke üleöö (ca 17h) 15 ml YPD vedelsöötmes ning koguti tsentrifuugides (*Eppendorf Centrifuge* 5415 R; 1 min; 2300 RCF; 4 °C). Rakusadet pesti 1 ml mQ veega ja suspendeeriti 1 ml-is külmas 2M LiOAc lahuses. Rakususpensiooni inkubeeriti 5 minutit jääl, rakud koguti tsentrifuugides (1 min; 2300 RCF; 4 °C). Rakusade suspendeeriti 1 ml jääkülma 0,4 M NaOH lahusega ja korraldati inkubeerimist jääl 5 minutit. Seejärel koguti rakud tsentrifuugides, (1 min; 2300 RCF; 4 °C) ja eemaldati supernatant. Valkude denatureerimiseks suspendeeriti rakke 100 µl 2xSDS puhvris (4% SDS; 20% glütserool; 0,01% bromofenool sinine; 100 mM Tris pH 6,8; 100 mM β-merkaptotetanool) ja sonikeeriti 30 sekundit (*Diagenode Bioruptor®*; sonikeerimistugevus H(*high*)). Peale sonikeerimist asetati tuubid 5 minutiks termostaati 95 °C-le, segati segajal 10 sekundit (maksimum tugevus) ja tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge* 5415 D; 5 minutit; 16100 RCF; toatemperatuuril). 100 µl supernatanti kanti uude 1,5 ml tuubi.

2.2.9 Western blot

Valgud denatureeriti 95°C, 5 minutit. Rakulüsaadist kanti geelile 10 µl ning lahutati molekulmassi järgi kasutades 15%-list SDS-polüakrüülamiidgeeli.

15% SDS-polüakrüülamiidgeeli lahutava osa koostis:

Materjalid	Kogus
Destilleeritud vesi	1,1 ml
30% polüakrüülamiid	2,5 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml
10% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)	50 µl
10% APS (ammoonium persulfaat)	50 µl
TEMED (tetrametüületüleendiamiin)	2 µl
Kokku	5 ml

5% SDS-polüakrüülamiidgeeli kontsentreeriva osa koostis:

Materjalid	Kogus
Destilleeritud vesi	2,7 ml
30% polüakrüülamiid	0,67 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	4 µl
Kokku	4 ml

Valgud lahutati kasutades 1xSDS jooksupuhvrit (0,5% SDS; 0,125M Tris-HCl pH 6,8; 0,96 M glütsiin). Kontsentreeriva geeli ulatuses kasutati pinget 125V, lahutava osa ulatuses 170V.

Järgnevalt kanti valgud akrüülamiidgeelilt üle PVDF membraanile (*Thermo Scientific PVDF Transfer Membrane*; 0,2 µm). Selleks inkubeeriti geeli 10 minutit poolkuiva süsteemi ülekandepuhvris (48 mM Tris; 39 mM glütsiin; 0,037% SDS; 20% metanool). PVDF membraani loputati enne valkude ülekandeprotsessi metanoolis ja seejärel 15 minutit loksutil ülekandepuhvris. Valkude seondamine PVDF membraanile toimus pool-kuiva ülekande aparaadis (*BIO-RAD Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*) pingel 15 V 45 minuti jooksul. Järgnevalt blokeeriti PVDF membraani, 1 tunni jooksul lõssi lahusega (50ml, 1xTBS, 5% lõssipulbrit (*CARL ROTH Skimmed milk powder*)). Järgmises etapis lisati primaarse antikeha (*ANTI-FLAG®M2 Sigma-Aldrich F3165*) lahus (1xTBS, 2% lõssipulbrit, primaarne antikeha lahjendusega 1:10 000) ning membraani inkubeeriti üleöö 4 °C.

Järgnevalt pesti membraani kolm korda TBST lahuses (1x TBS, 0,05% BioTop Tween 20), millele järgnes inkubatsioon sekundaarse antikeha (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody*,

HRP, Invitrogen™) lahusega (10 ml, 1xTBS, 2% lõssipulbrit, sekundaarset antikeha lahjendusega 1:10000) 1h toatemperatuuril. Pärast inkubatsiooni korrati membraani pesemise etappi kolmel korral 5 minuti jooksul TBST lahusega.

Viimase etapina inkubeeriti membraani 1,5 ml luminoli ja peroksiidi lahusega (1:1) ja inkubeeriti 5 minutit, peale seda membraan kuivatati ja signaal detekteeriti kasutades masinat *BIO-RAD ChemiDoc™ XRS+ System* ja *Image Lab™ 6.0* programmi.

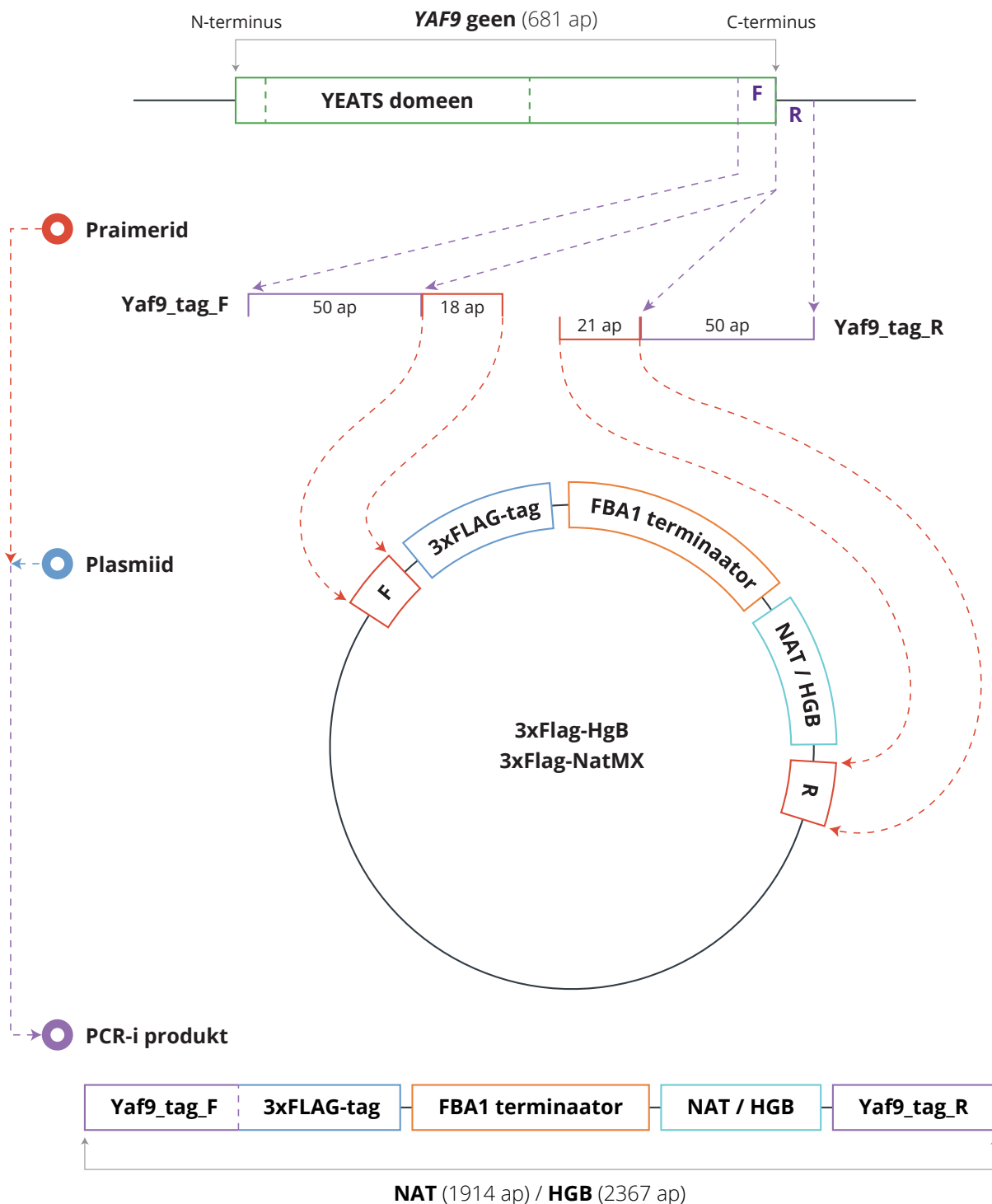
2.3 Tulemused

Pärmi *Saccharomyces cerevisiae* kahe kompleksi *SWR1* ja *NuA4* koosseisu kuuluv Yaf9 valk ei ole pärmi eluks hädavajalik, kuid mutantides, kus Yaf9 valku ei ekspresseerita, on normaalne rakutalitus pärsitud (Zhang *et al.*, 2004). Yaf9 üheks rolliks *SWR1* ja *NuA4* kompleksides on Yaf9 võime seonduda histooni H3 saba atsetüleeritud aminohappejääkidega YEATS-domeeni abil (Klein *et al.*, 2018), kuid Yaf9 peab panustama *SWR1* ja *NuA4* komplekside talitusse veel mitmel erineval viisil. Näiteks Yaf9 puudumisel on pärmirakkude telomeeride lähedal väiksem transkriptsiooniline aktiivsus, mis korreleerub samas piirkonnas vähendatud H4 histoonide atsetüleerimisega ja väiksema Htz1/H2B dimeeride olemasoluga (Zhang *et al.*, 2004). Lisaks on leitud ka, et *NuA4* kompleksi puhul võib Yaf9 roll olla regulatoorne või seotud *NuA4* kompleksi lokaliseerimiseks kindlatesse kromatiini piirkodadesse (Zhang *et al.*, 2004). Üldpildis puudub hetkel täpne ülevaade viisidest ja mehhanismidest, mismoodi Yaf9 valk *SWR1* ja *NuA4* komplekside talitamisest panustab (Lu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2004), kuid on selge, et üheks tähtsaks Yaf9 valgu osaks on selle YEATS-domeen, ilma milleta on Yaf9 valk ebastabiilne ja vastavalt muteeritud pärmirakkudes ainult vaevu detekteeritaval tasemel ekspresseeritud (Zhang *et al.*, 2004), see asjaolu teeb ka Yaf9 YEATS-domeeni funktsiooni uurimise keeruliseks.

2.3.1 Flag-epitooipi kodeeriva järjestusega DNA fragmentide sünteesimine

YEATS-domeeni leidub *S. cerevisiae*'s peale Yaf9 veel ka valkudes Taf14 ja Sas5 (Schulze *et al.*, 2009). Antud töö eesmärk oli konstrueerida mudelsüsteemina pagaripärmi tüved, kus Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriv järjestus oleks vahetatud Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni kodeeriva järjestuse vastu. Vahetatud YEATS-domeeniga Yaf9 valgu ekspressiooni detekteerimiseks lisati Yaf9 C-terminaalsele osale Flag-epitooipi kodeeriv järjestus (*3xFLAG-tag*). Selle tarbeks tuli esmalt sünteesida transformatsiooniks kasutatavad DNA fragmendid, mis sisaldaksid: homoloogilise rekombinatsiooni jaoks *YAF9* geeni C-terminaalse piirkonnaga homoloogilisi järjestusi, valgu ekspressiooni detekteerimiseks *3xFLAG-tag*'i kodeerivat järjestust, *FBA1* terminaatorjärjestust ja selektsiooni tarbeks antibiootikumile resistentsust tagavat markergeeni järjestust. Katse edukuse tõenäosuse tõstmiseks sünteesiti DNA fragmendid kahes variandis: antibiootikumi *nourseothricin* vastu resistentsuse tagava *natMX6* markergeeniga variant (NAT) ning antibiootikumi hügromütsiin-B vastu resistentsuse tagava *hghMX* markergeeniga variant (HGB). Selgitav skeem Flag-epitooipi kodeeriva järjestusega DNA fragmentide sünteesimisest on nähtav jooniselt 6.

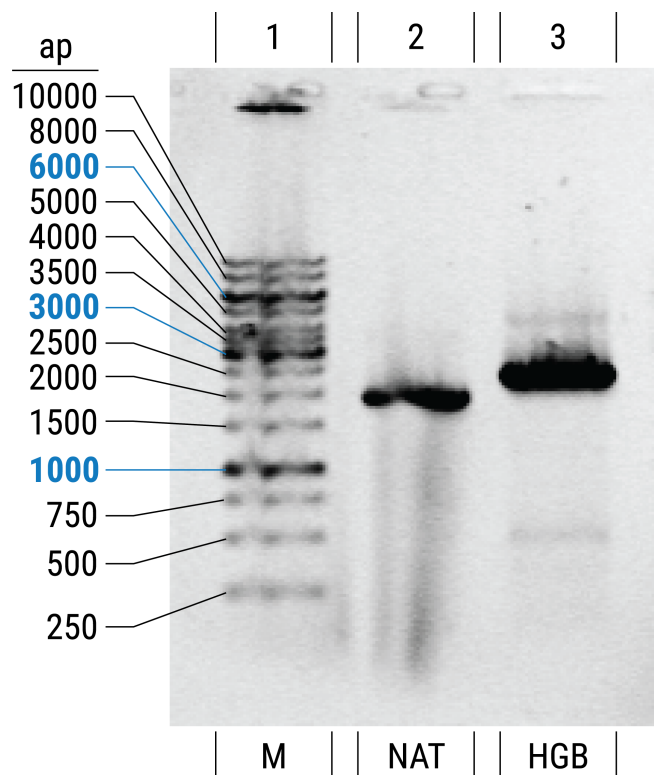
Metsiktüüpi YAF9 geen (*S. cerevisiae* kromosoom XIV vahemik 420098..420778)



Joonis 6. Transformatsiooniks kasutatavate Flag-epitoopi ja markerjärjestust kodeerivate DNA fragmentide sünteesimise skeem. Skeemil olevad elemendid ei ole suurusepõhistes proportsioonides ja skeem on illustreeriv. Skeemil on näha YAF9 geeni ülesehitus (roheline ring) ja kuidas 50 ap (aluspaari) enne ja 50 ap pärast Yaf9 C-terminaalsest osa on homologseda alad „sabaga“ praimerite (punane ring) Yaf9_tag_F ja Yaf9_tag_R välimiste osadega (lillad). Praimerite sisemised osad (punased) on komplementaarsed plasmidi (sinine ring) 3xFlag-NatMX või 3xFlag-HgB olevate aladega. Praimerite abil sünteesiti plasmiididelt PCR meetodiga produktid, mida on näha skeemi alumises osas (lilla ring). Marker geen *natMX6* on joonisel tähistatud nimega NAT ja marker geen *hghMX* nimega HGB.

Transfektsiooniks kasutatud PCR fragmendid sünteesiti plasmiidelt 3xFlag-NatMX (*natMX6* markergeeniga fragmentide jaoks) ja 3xFlag-HgB (*hghMX* markergeeniga fragmentide jaoks) kasutades geenispetsiifilisi „sabaga“ praimereid Yaf9_tag_F ning Yaf_9_tag_R. Praimeri Yaf9_tag_F 5' ots on komplementaarne järjestusega, mis jääb 53 ap (aluspaari) Yaf9 lõppkoodonist ülesvoolu ja 3' ots komplementaarne plasmidi järjestustega, mis jääb 3xFLAG-tag järjestusest 18 ap ülesvoolu. Praimeri Yaf_9_tag_R 5' ots on komplementaarne järjestusega, mis jääb YAF9 lõppkoodonist 50 ap allavoolu ja 22 ap allavoolu plasmiidil olevast markergeenist.

PCR-i meetodil sünteesitud fragmente kontrolliti agaros-geelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil (joonis 7). Esimesele rajale kanti DNA-suurusmarker (1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*), teisele rajale 5 µl *natMX6* markergeeniga PCRi produktist ja kolmandale rajale 5 µl *hghMX* markergeeniga PCRi produktist. DNA-suurusmarkeri kohaselt oli teisel rajal asuv *natMX6* markergeeniga proov (NAT) ja kolmandal rajal asuv *hghMX* markergeeniga proov (HGB) kooskõlas oodatud fragmentide suurusega (NAT – 1914 ap ja HGB – 2367 ap).

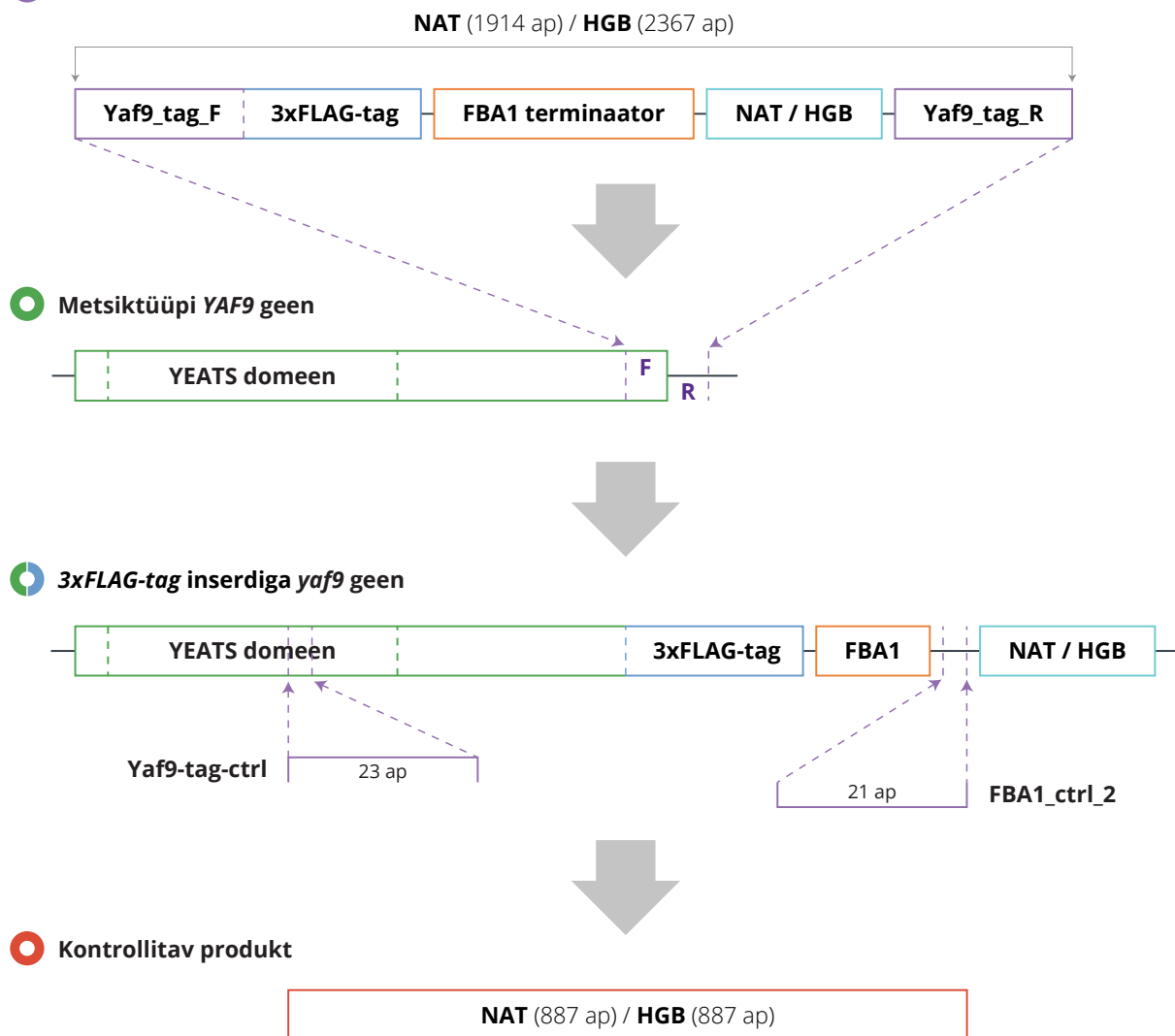


Joonis 7. Transformatsiooniks kasutatavate Flag-epitooopi ja markerjärjestust kodeerivate DNA fragmentide sünteesimise tulemuste kontrollimine. Fragmendid sünteesiti PCR meetodil, kontrolliti 0,8% agaros-geelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil. Rajal #1 on 1kb DNA-suurusmarker *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*, rajal #2 on *natMX6* markergeeniga proov (NAT), mille oodatud suurus on 1914 ap (aluspaari) ja rajal #3 on *hghMX* markergeeniga proov (HGB), mille oodatud suurus on 2367 ap.

2.3.2 Flag-epitoobi järjestusega DNA fragmendi transformatsioon rakkudesse ja homoloogilise rekombinatsiooni toimumise kontrollimine

3xFLAG-tag'i ja markergeeni omavate järjestustega PCR-i produktid transformeeriti elektroporeerimismeetodi abil tüvesse AKY202 (käesoleva töö metsiktüüpi tüvi). PCR-i produktide homoloogilise rekombinatsiooni ja kontrollimise skeem on nähtav jooniselt 8.

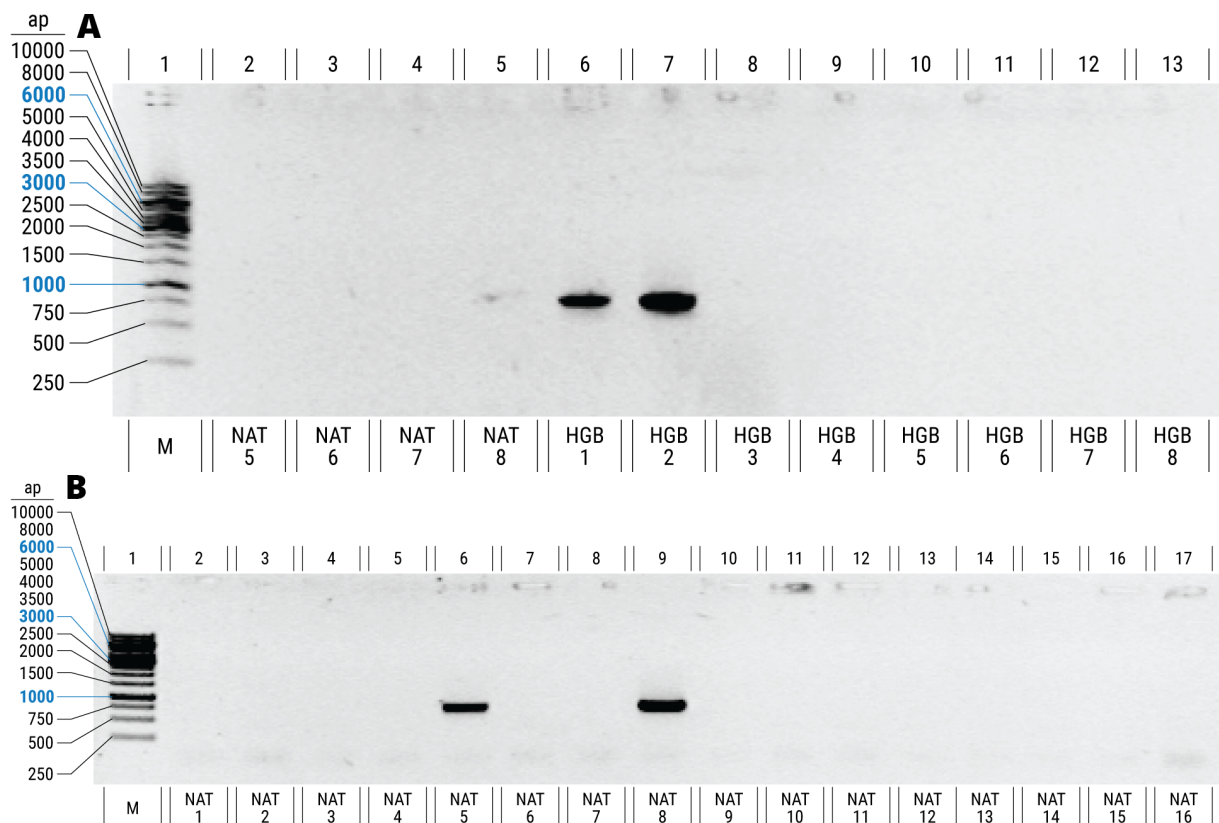
● Sünteesimise produkt



Joonis 8. Flag-epitoobiga DNA fragmendi homoloogilise rekombinatsiooni ja kontrollimise skeem. Skeemil olevad elemendid ei ole suurusepõhistes proportsioonides ja skeem on illustreeriv. Skeemil on näha Flag-epitoopi (3xFLAG-tag) ja *natMX6* (NAT) või *hghMX* (HGB) markergeeni sisaldava PCR-i produkti (lilla ring) sisenemist *YAF9* geeni (roheline ring) C-terminusse. Homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena tekib muteeritud *yaf9* geen (rohesinine ring), mis sisaldab C-terminuses 3xFLAG-tag järjestust. Peale Flag-epitoobi kandub genoomi eraldiseisvana üle ka *FBA1* terminaatorjärjestus ning *natMX6* või *hghMX* markergeen. Homoloogilist rekombinatsiooni kontrolliti PCR-i abil, kasutades praimereid Yaf9-tag-ctrl ja FBA1_ctrl_2, mille abil amplifitseeriti *yaf9* C-terminuse piirkond (punane ring).

Antibiootikumi (*nourseothricin* (+NAT) või hügromütsiin-B (+HGB)) sisaldaval selektiivtassil kasvanud kolooniatest eraldati DNA liitumatsetaadi meetodil ning sellelt amplifitseeriti PCR-iga *yaf9* C-terminuse piirkond. PCR-i jaoks kasutatud Yaf9-tag-ctrl ja FBA1_ctrl_2 praimeritega tekib 887 ap suurune produkt ainult juhul, kui *FLAG-tag*'i kodeeriva ala integreerimine Yaf9 valku kodeeriva ala lõppu on õnnestunud. PCR-i reaktsioonid kanti 0,8%-lisele agarosgeelile (joonis 9). Kokku kontrolliti +NAT selektiivtassilt 16 kolooniat ja +HGB selektiivtassilt 8 kolooniat.

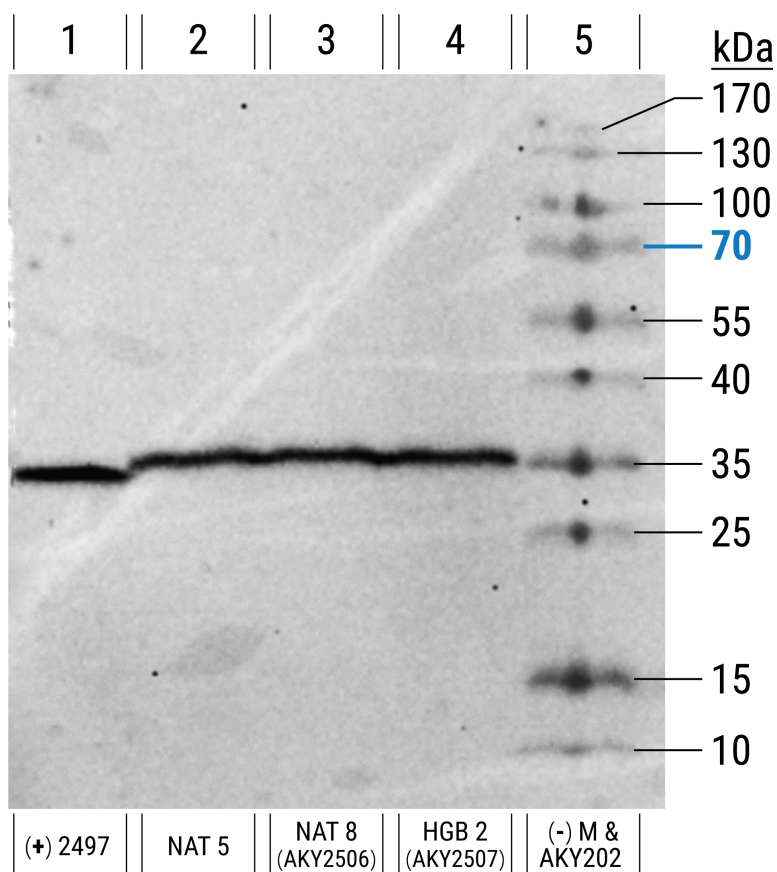
Joonisel 9 toodud agarosgeelil kasutati mõlema paneeli puhul esimesel rajal alati DNA-suurusmarkerit 1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*. Esimesel kontrollil ühtegi PCR produkti ei tuvastatud. Teise kontrollimisseeria käigus, mida on kujutatud paneelil A, saadi kaheksast HGB selektiivtassil kasvanud kolooniast (rajad #6-#13) õige suurusega (887 ap) PCR produkt radadel #6 ja #7 olevatest proovidest, millele vastasid kolooniad HGB 1 ja HGB 2. Kolmanda kontrollimisseeria käigus, mida on kujutatud paneelil B, andis kuueteistkümnest NAT selektiivtassil kasvanud kolooniast (rajad #2-#17) õige suurusega signaali (887 ap) PCR produkt radadel #6 ja #9 olevatest proovidest, millele vastasid kolooniad NAT 5 ja NAT 8.



Joonis 9. C-terminaalse Flag-epitooipiga Yaf9 kolooniate kontrollimine. DNA fragmendid amplifitseeriti PCR meetodil, kontrolliti 0,8% agarosgeelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil. Mõlema paneeli (A ja B) rajal #1 on DNA-suurusmarker (1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Õigete kolooniate puhul on PCR fragmentide suurus mõlema markergeeniga kolooniate proovidel 887 ap. **Paneelil A** on radadel #2-#5 proovid vastavalt kolooniatest NAT 5-8. Radadel #6-#13 on vastavalt kolooniate HGB 1-8 proovid. **Paneelil B** on radadel #2-#17 proovid vastavalt kolooniatest NAT 1-16.

2.3.4 Flag-epitoobi ekspressiooni kontrollimine

PCR-i põhine kontroll näitas, et valitud kolooniates oli Flag-epitoobi järjestus edukalt Yaf9 valgu kodeeriva järjestuse lõppu lisatud. Kontrollimaks, et järjestus on integreerunud nii, et Flag-epitoobiga valgu ekspressiooni on võimalik ka detekteerida, kasutati *Western blot* meetodit. Proovid lahutati 15% SDS-polüakrüülamiidgeelil, kanti üle PVDF membraanile, inkubeeriti primaarse antikeha *ANTI-FLAG®M2* (*Sigma-Aldrich F3165*) ja sekundaarse antikehaga *Goat anti-Mouse IgG HRP* (*Invitrogen™*) ning visualiseeriti (joonis 10). Rajale #1 kanti positiivse kontrollina tüve AKY2497 proov, mille Yaf9 valgu N-terminusse on lisatud *FLAG-tag*. Radadele #2, #3 ja #4 kanti proovid vastavalt kolooniatest NAT 5, NAT 8 ja HGB 2. Kõikide kloonide puhul detekteeriti signaal 35 kDa lähedal, mis vastab ennustuslikule Yaf9-3xFlag valgu suurusele. Rajale #5 kanti negatiivse kontrollina antud töö metsiktüüpi tüvi AKY202 ja suurusmarker *Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder*. Säilitamiseks ja hilisemaks kasutamiseks tehti kolooniast NAT 5 tüvi AKY2506 ja kolooniast HGB 2 tüvi AKY2507



Joonis 10. Flag-epitoobiga Yaf9 valgu detekteerimine *Wester blot* meetodil. Proovid on lahutatud 15% SDS-polüakrüülamiidgeelil. Primaarse antikehana kasutati *ANTI-FLAG®M2* ja sekundaarse antikehana *Goat anti-Mouse IgG HRP* antikeha. Rajal #1 on positiivse kontrollina proov tüvest AKY2497. Rajal #2 ja #3 on vastavalt proovid kolooniatest NAT 5 ja NAT 8 (hiljem tüvi AKY2506). Rajal #4 on proov kolooniast HGB 2 (hiljem tüvi AKY2507). Rajal #5 on negatiivse kontrollina proov tüvest AKY202 ja suurusmarker (*Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder*).

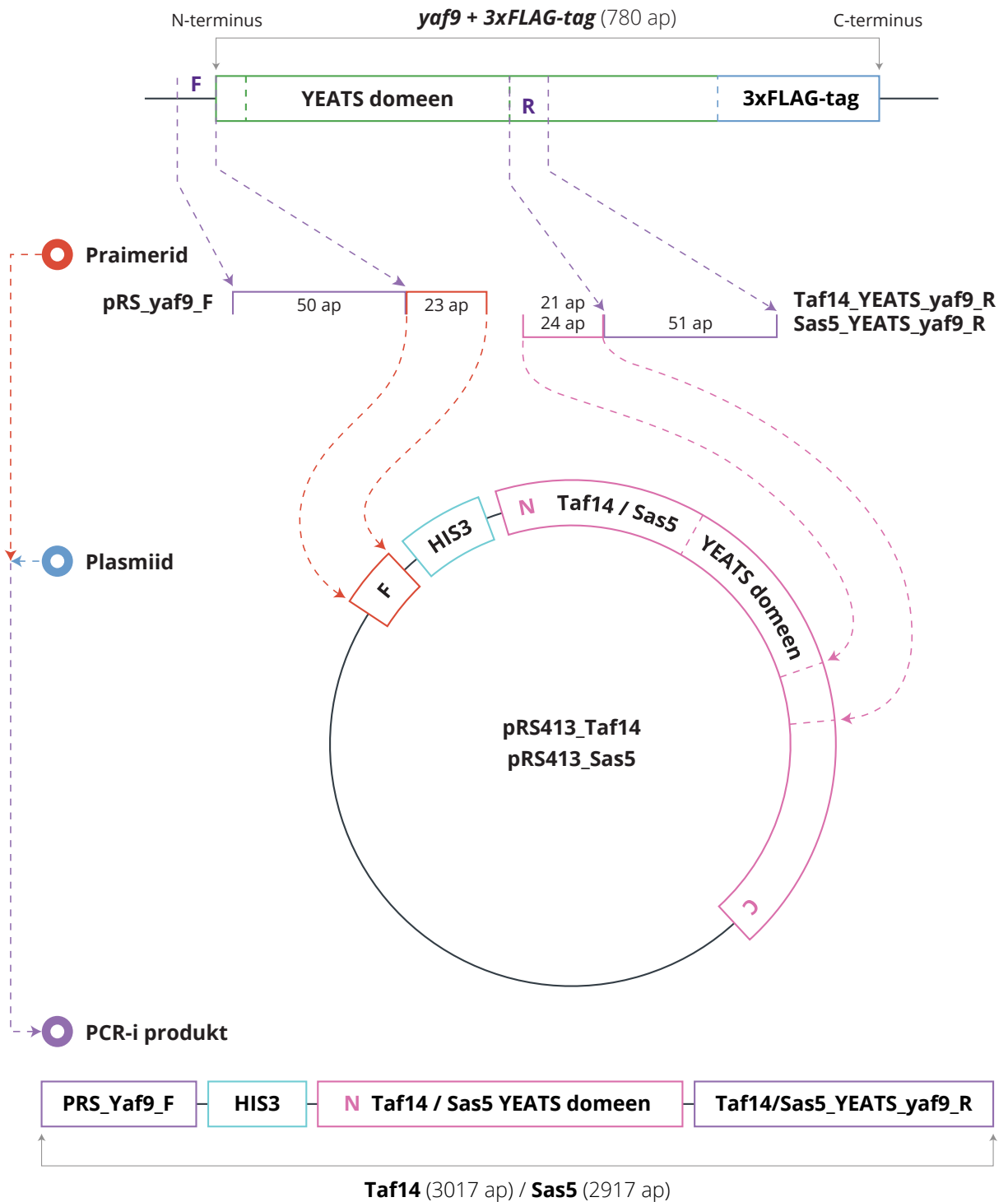
2.3.5 DNA fragmendi sünteesimine Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriva osa väljavahetamiseks

Selleks, et vahetada Yaf9 YEATS-domeen välja Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni vastu, tuli sünteesida Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni kodeerivad DNA fragmendid, mille välimised järjestused oleksid homoloogsed genoomis Yaf9 N-terminust ja YEATS-domeeni kodeerivaid alasid ümbritsevate järjestustega. Yaf9 N-terminuse kodeerivast alast vahetati välja 369 ap kas Taf14 YEATS-domeeni kodeeriva ala vastu (447 ap) või Sas5 YEATS-domeeni kodeeriva ala vastu (340 ap). Fragmentide sünteesimiseks kasutati PCR meetodit. Taf14 YEATS-domeeniga fragmendi sünteesimiseks kasutati plasmidi pRS413_Taf14 ja Sas5 YEATS-domeeniga fragmendi sünteesimiseks plasmidi pRS413_Sas5. Hilisemaks kolooniate selekteerimiseks sünteesiti DNA fragmendid koos *HIS3* markeergeeniga (tagab histidiini sünteesimise võime), mis asus plasmiididel *TAF14* ja *SAS5* geenijärjestustest ülesvoolu. Selgitav skeem fragmentide sünteesimisest on nähtav jooniselt 11.

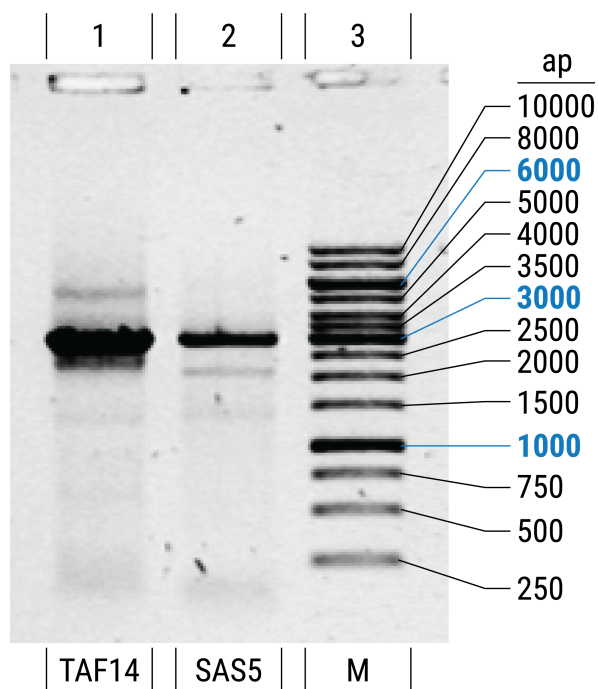
DNA fragmendi sünteesimiseks kasutati „sabaga“ praimereid pRS_yaf9_F, Taf14_YEATS_yaf9_R ja Sas5_YEATS_yaf9_R. Praimer pRS_yaf9_F 5' ots on komplementaarne alaga *yaf9* geeni algusest 50 ap ülesvoolu ja 3' ots komplementaarne 23 ap pikkuse alaga plasmiidil asuvast *HIS3* geenist ülesvoolu. Praimerite Taf14_YEATS_yaf9_R ja Sas5_YEATS_yaf9_R 5' ots on komplementaarne alaga, mis jääb *yaf9* geeni algusest 369 ap allavoolu. Taf14_YEATS_yaf9_R puhul on 3' ots komplementaarne alaga, mis jääb plasmiidil *TAF14* geeni algusest 447 ap allavoolu ning Sas5_YEATS_yaf9_R puhul on 3' ots komplementaarne alaga, mis jääb plasmiidil *SAS5* geeni algusest 340 ap allavoolu.

PCR-i meetodil sünteesitud fragmente kontrolliti agaros-geelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil (joonis 12). Esimesele rajale kanti 5 µl pRS413_Taf14 plasmiidilt sünteesitud produkti, teisele rajale pRS413_Sas5 plasmiidilt sünteesitud produkti ja kolmandale rajale kanti DNA-suurusmarker (1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Saadud PRC-i produktid vastasid oodatud fragmentide suurusele (Taf14 – 3017 ap ja Sas5 – 2917 ap), ülejäänud 45 µl-ist PCR proovist sadestati DNA ja mõlemad produktid transformeetiti AKY2507 pärmitüvesse.

Muteeritud *yaf9* geen



Joonis 11. Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriva osa väljavahetamiseks vajalike DNA fragmentide sünteesimise skeem. Skeemil olevad elemendid ei ole suurusepõhistes proportsioonides ja skeem on illustreeriv. Skeemil on näha muteeritud 3xFLAG-tag järjestust omava *yaf9* geeni ülesehitus (rohe-sinine ring) ja sellel olevaid alasid (F ja R), mis on homoloogsed „sabaga“ praimerite (punane ring) pRS_yaf9_F, Taf14_YEATS_yaf9_R ja Sas5_YEATS_yaf9_R välimiste osadega (lillad). Praimerite sisemised osad (punane ja roosa) on komplementaarsed plasmiidil (sinine ring) pRS413_Taf14 või pRS413_Sas5 olevate aladega selliselt, et vahele jääb markergeen *HIS3* ja *TAF14* või *SAS5* N-terminaalne ala koos YEATS-domeeniga. Praimerite abil sünteesiti PCR-iga plasmiididelt produktid, mida on näha skeemi alumises osas (lilla ring).

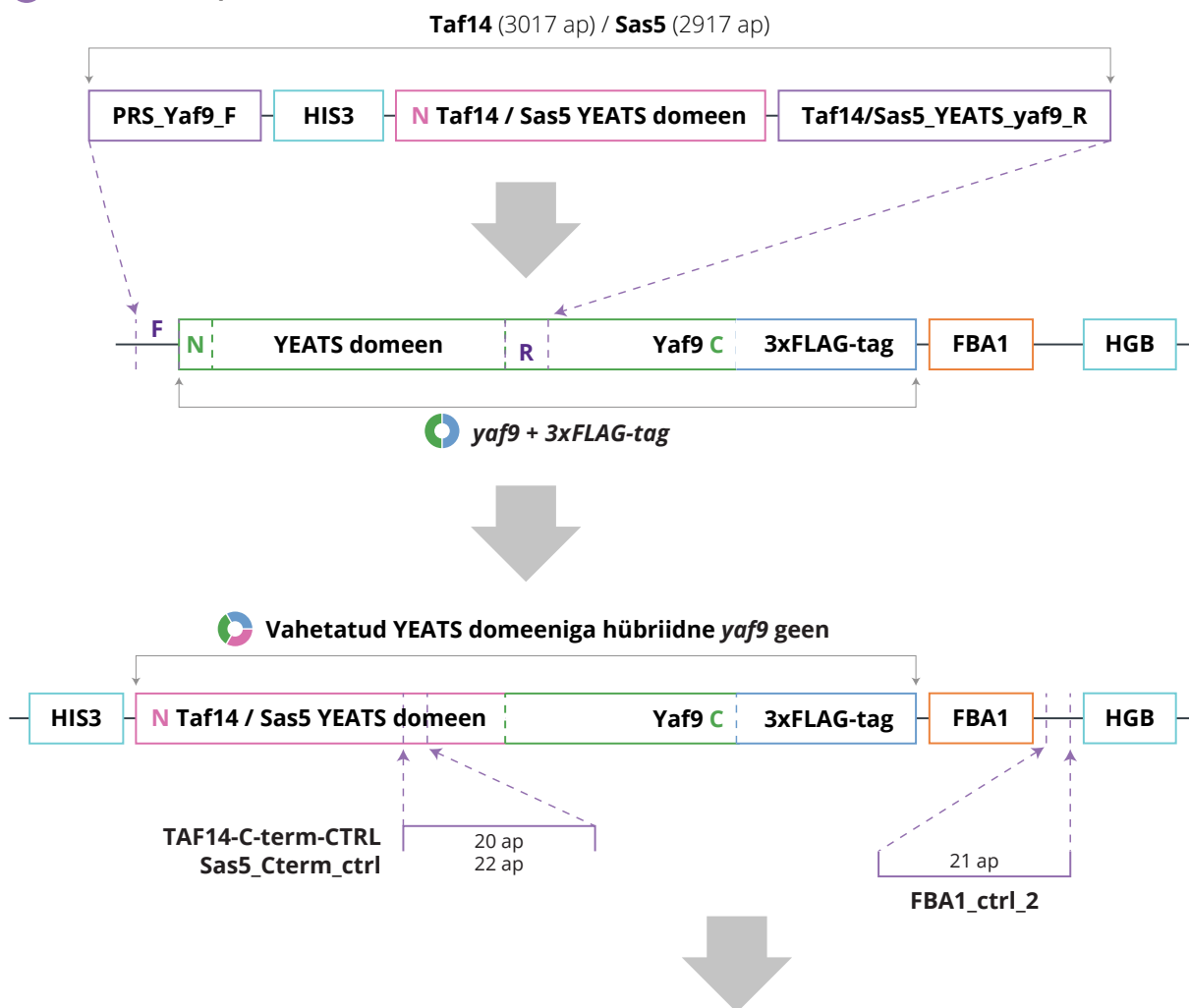


Joonis 12. Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriva osa väljavahetamiseks vajalike DNA fragmentide sünteesimise tulemuste kontrollimine. Fragmentid sünteesiti PCR meetodil, kontrolliti 0,8% agaros-geelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil. Rajal #1 on Taf14 järjestust sisaldav proov, mille oodatud suurus on 3017 ap. Rajal #2 on Sas5 järjestust sisaldav proov, mille oodatud suurus on 2917 ap. Rajal #3 on 1kb DNA-suurusmarker *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*.

2.3.6 Erinevaid YEATS-domeene kodeerivate järjestustega DNA fragmentide transformatsioon rakkudes ja homologilise rekombinatsiooni kontrollimine

Yaf9 YEATS-domeeni väljavahetamiseks transformeeriti Taf14 ja Sas5 YEATS-domeeni järjestusi sisaldavad PCR-i produktid eelnevalt sama töö käigus konstrueeritud pärmütüvesse AKY2507. Transformatsioon viidi paralleelselt läbi nii Taf14 YEATS-domeeniga Yaf9 valku ekspresseeriva tüve kui ka Sas5 YEATS-domeeniga Yaf9 valku ekspresseeriva tüve konstrueerimise jaoks. Edukalt transformeerunud pärmirakkudes vahetati Yaf9 kodeeriva ala alguses välja YEATS-domeeni kodeeriv Yaf9 piirkond, kas *HIS3* markergeeni ja Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni kodeeriva järjestuse vastu (joonis 13). Histidiini mitte sisaldaval selektiivsootmel (-HIS) kasvanud kolooniatest eraldati liitiumatsetaadi meetodil DNA ning sellelt amplifitseeriti PCR-iga osaliselt YEATS-domeeni ja Yaf9 C-terminaalset piirkonda kodeeriv DNA fragment. PCR-i jaoks kasutati praimereid TAF14-C-term-CTRL ja FBA_ctrl_2 või Sas5_Cterm_ctrl ja FBA1_ctrl_2. Praimer TAF14-C-term-CTRL seondub järjestusega mis jääb muteeritud *yaf9* geeni algusest 340 ap allavoolu. Praimer Sas5_Cterm_ctrl seondub järjestusega, mis jääb muteeritud *yaf9* geeni algusest 230 ap allavoolu. Praimer FBA1_ctrl_2 seondub järjestusega, mis jääb eelnevalt lisatud *3xFLAG-tag* järjestusest 364 ap allavoolu. Edukalt toimunud homologilise rekombinatsiooni puhul amplifitseeriti ülesse 859 ap (Taf14) ja 864 ap (Sas5) suurused fragmendid.

Sünteesimise produkt



Kontrollitav produkt

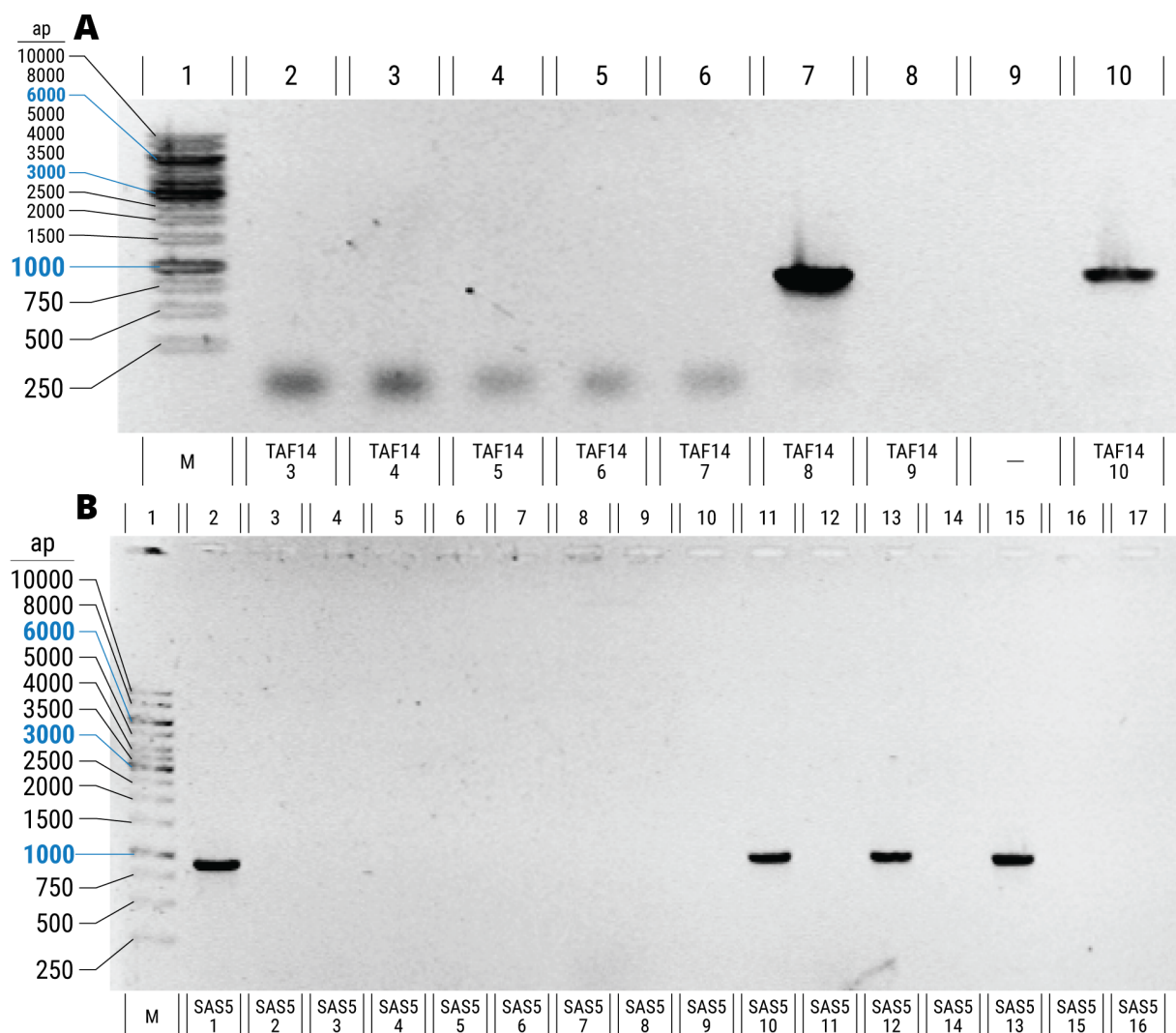
Taf14 (859 ap) / Sas5 (864 ap)

Joonis 13. Yaf9 YEATS-domeeni väljavahetuse ja homoloogilise rekombinatsiooni kontrollimise skeem. Skeemil olevad elemendid ei ole suurusepõhistes proportsioonides ja skeem on illustreeriv. Skeemil on näha Flag-epitoobi järjestusega Yaf9 (rohe-sinine ring) N-terminaalse osa (YEATS-domeeni) väljavahetamist *HIS3* markergeeni ja *taf14*-e või *sas5*-e N-terminust (koos YEATS-domeeniga) sisaldava PCR-i produkti vastu (lilla ring). Homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena tekib hübriidne *yaf9* geen (rohe-sini-roosa ring). Sisestatud markergeen *HIS3* asub muteeritud *yaf9* geeni järjestusest eraldiseisvana ülesvoolu. Homoloogilise rekombinatsiooni toimumist kontrolliti PCR-iga, kasutades praimereid TAF14-C-term-CTRL, Sas5_Cterm_ctrl ja FBA1_ctrl_2, mille abil amplifitseeriti ala kuhu sisse jäi Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni ja Yaf9 C-terminuse piirkond (punane ring).

Sünteesitud fragmente kontrolliti agaros-geelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil (joonis 14). Kokku kontrolliti transformatsioonitassilt 24 kolooniat Taf14-e ja 32 kolooniat Sas5-e .

Joonisel 14, paneelil A on rajale #1 kantud DNA-suurusmarker (1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Radadel #2-#8 on proovid vastavalt kolooniatest Taf14 3-9, rajale #9 ei ole kantud proovi ja rajal #10 on proov kolooniast Taf10. Radadel #8 ja #10 (vastavalt kolooniatest Taf14 9 ja 10) asuvates proovide detekteeriti õige suurusega PCR fragment (859 ap). Rajal #8 oleva proovi eriti tugeva signaali põhjus ei ole teada, kuid võib olla seotud proovide ettevalmistamisega.

Joonisel 14, paneelil B on rajale #1 kantud DNA-suurusmarker (1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*) ja radadele #2-#17 proovid vastavalt kolooniatest Sas5 1-16, millest õige suurusega produkti (864 ap) andsid radadel #2, #11, #13 ja #15 asuvad proovid vastavalt kolooniatest Sas5 1, 10, 12 ja 13.

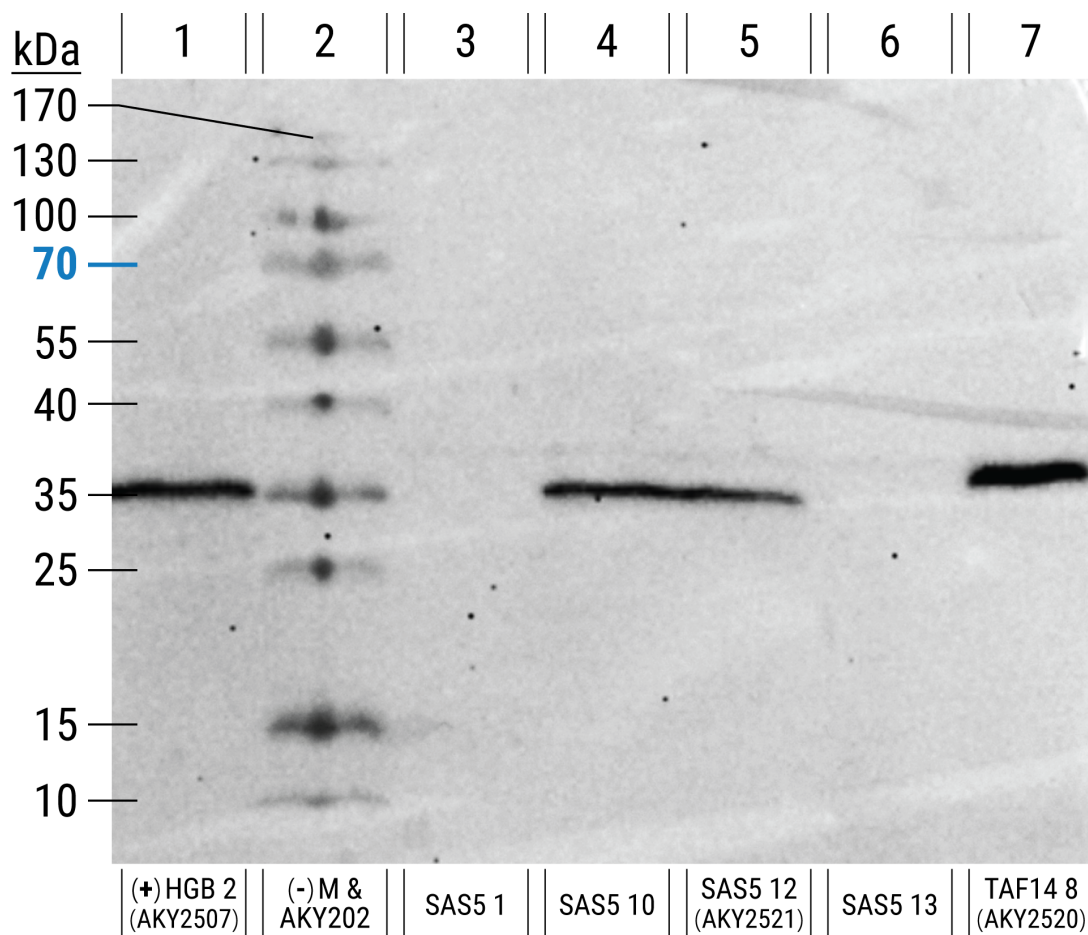


Joonis 14. Yaf9 YEATS-domeeni vahetuse kontrollimine. Fragmentide amplifitseeriti PCR meetodil, kontrolliti 0,8% agaros-geelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil. Mõlema paneeli (A ja B) rajal #1 on DNA-suurusmarker (1kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Oodatud fragmentide suurus Taf14 kolooniate proovidest on 864 ap ja Sas5 kolooniate proovidest 859 ap. **Paneelil A** on radadel #2-#8 ja #10 proovid vastavalt kolooniatest Taf14 3-9 ja Taf14 10. Rada #9 on ilma proovita. **Paneelil B** on radadel #2-#17 proovid vastavalt kolooniatest Sas5 1-16.

2.3.7 Hübriidsete YEATS-domeeniga valkude ekspressiooni kontrollimine

PCR-i põhine kontroll näitas, et valitud kolooniates oli edukalt õnnestunud Yaf9 YEATS-domeeni kodeeriv ala vahetada kas Taf14 või Sas5 YEATS-domeeni kodeeriva ala vastu. Tuvastamaks, kas muteeritud Yaf9 valk pärast sellist ümberkorraldust ka ekspresseerub, viidi läbi *Western blot'i* analüüs. Proovid lahutati 15% SDS-polüakrüülamiidgeelil, kanti PVDF membraanile, inkubeeriti primaarse antikeha ANTI-FLAG®M2 (*Sigma-Aldrich F3165*) ja sekundaarse antikeha *Goat anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen™)* ja visualiseeriti (joonis 15). Rajal #1 on positiivse kontrollina antud töö käigus konstrueeritud proov tüvest AKY2507, mille Yaf9 valgu C-terminusse on lisatud 3xFLAG-tag. Rajale #2 kanti negatiivse kontrollina antud töö metsiktüüpi tüvi AKY202, mis oodatult signaali ei andnud ja suurusmarker *Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder*. Rajale #3 kanti koloonia Sas5 1 proov, mille puhul oli küll PCR-iga detekteeritud õige suurusega produkt, kuid hübriidse valgu ekspressioon ei ole selle klooni puhul detekteeritav. Selle põhjuseks võib olla homologse rekombinatsiooni käigus tekkinud viga kodeerivas järjestuses, mis võis põhjustada näiteks stoppkoodoni tekkimise kodeerivasse alasse. Radadele #4 ja #5 kanti vastavalt kolooniad Sas5 10 ja Sas5 12, mille puhul detekteeriti ka ennustuslikult umbes 35 kDa suurune hübriidne valk. Rajale #6 kantud koloonia Sas5 13 proovi puhul jällegi hübriidse valgu ekspressiooni ei tuvastatud, põhjus võib olla sarnane rajale #3 kantud prooviga. Rajale #7 kanti koloonia Taf14 8 proov, mille puhul detekteeriti hübriidse valgu ekspressioon. Seejuures liigub selline hübriidne Taf14 YEATS-domeenist ja Yaf9 C-terminaalsest osast koosnev valk kasutatud geelis ennustuslikust 35 kDa suurusest natuke kõrgemal.

Säilitamiseks ja hilisemaks kasutamiseks tehti koloonia Sas5 12 tüveks AKY2521 ja koloonia Taf14 8 tüveks AKY2520.



Joonis 15. Vahetatud Yaf9 YEATS-domeeniga valkude ekspressiooni detekteerimine *Western blot* meetodi abil. Proovid on lahutatud 15% SDS-polüakrüülamiidgeelil. Primaarse antikehana kasutati ANTI-FLAG®M2 (*Sigma-Aldrich F3165*) ja sekundaarse antikehana *Goat anti-Mouse HRP*, (*Invitrogen™*). Rajal #1 on positiivse kontrollina proov tüvest AKY2507 (varem koloonia HGB 2). Rajal #2 on negatiivse kontrollina proov tüvest AKY202 ja suurusmarker (*Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder*). Rajal #3 on proov kolooniast Sas5 1. Rajal #4 on proov kolooniast Sas5 10. Rajal #5 on proov kolooniast Sas5 12 (hiljem tüvi AKY2521). Rajal #6 on proov kolooniast Sas5 13. Rajal #7 on proov kolooniast Taf14 8 (hiljem tüvi AKY2520).

2.4 Arutelu

Antud töö eesmärgiks olnud Yaf9 valgu YEATS-domeeni vahetus viidi läbi edukalt ja *S. cerevisiae* tüved, kus Yaf9 valgu YEATS-domeen vahetati Taf14 valgu YEATS-domeeni vastu või Sas5 valgu YEATS-domeeni vastu, on tehtud kontrollide põhjal võimalised ka vahetatud YEATS-domeeniga valku ekspresseerima.

Konstrueeritud pärmitüved tehti tüvest AKY202, milles on genoomist eemaldatud mõlemad histoon H3 ja H4 geenikoopiad ja eluks vajalikke histoone ekspresseeritakse plasmiidilt. Sellises pärmitüves on võimalik lihtsalt testida erinevaid mutantseid histoone ekspresseerivaid plasmide. Meie labori varasemate katsete põhjal on teada, et selline pärmitüvi, milles on deleteeritud Yaf9 valgu kodeeriv järjestus, ei suuda kasvada, kui lisaks on muteeritud ka erinevad N-terminaalsed H3 histooni lüsiinijäägid. Seega on huvitav küsimus, kas antud töös konstrueeritud hübriidseid Yaf9 valke kodeerivad tüved suudavad kasvada koos mutantse H3 histooniga.

Edasiste sammudena võiks uurida ka, kuidas sellised hübriidsed valgud võivad mõjutada erinevaid rakusiseseid protsesse. Näiteks on huvitav, kas ja kui palju *SWR1* ja *NuA4* kompleksid, mille koosseisu Yaf9 kuulub, muutusest Yaf9 YEATS-domeenis mõjutatud on. *SWR1* ja *NuA4* vastutavad paljude erinevate kromosoomiseoseliste protsesside eest, nagu geeniekspressioon, DNA metabolism, DNA parandamine ja histoonide väljavahetamine (Lawrence *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2004; Chittuluru *et al.*, 2011). Uurides nende protsesside toimimist peale antud töös läbiviidud Yaf9 YEATS-domeeni vahetust, aitaks edendada arusaama Yaf9 rollist ja toimemehhanismist antud kompleksides.

Kontrollimaks, kuidas muteeritud Yaf9 mõjutab pärmi võrreldes Yaf9 täieliku puudumisega rakust (tabel 2), tuleks viia läbi katsed DNA-d kahjustavate ainete, madala temperatuuri, UV-kiirguse ja kofeiiniga. Lisaks saaks täpsemalt uurida, kas muteeritud Yaf9 on säilitanud võime seonduda YEATS-domeeni abil histooni H3 saba atsetüleeritud aminohappejääkidega, nagu seda kirjeldab Klein *et al.* (2018). Samuti oleks võimalik uurida, kas muteeritud Yaf9 seondub samade histooni „sabade“ sihtmärkidega nagu metsiktüüpi tüves või seondub Yaf9 nüüd vastavalt vahetatud YEATS-domeenile, Sas5 või Taf14 sihtmärkidega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli konstrueerida *S. cerevisiae* tüved, kus Yaf9 valgu YEATS-domeeni kodeeriv järjestus oleks vahetatud valgu Taf14 või valgu Sas5 YEATS-domeeni kodeeriva järjestuse vastu ja kontrollida saadud hübriidsete valkude ekspressiooni.

Valkude ekspressiooni kontrollimiseks, tuli kõigepealt lisada Yaf9 valku kodeeriva järjestuse lõppu detekteerimisel kasutatavate antikehade seondamiseks Flag-epitooipi kodeeriv järjestus (3xFLAG-tag). Selle tarbeks konstrueeriti töö esimeses etapis tüve AKY202 baasil paralleelselt kaks erineva markergeeniga uut pärmitüve: AKY2506, markergeeniga *natMX6* (NAT) ja AKY2507, markergeeniga *hghMX* (HGB).

Töö teises etapis kasutati eelnevalt konstrueeritud tüve AKY2507 ning *TAF14* ja *SAS5* geene kandvaid plasmide *pRS413_Taf14* ja *pRS413_Sas5*. Plasmiidide pealt sünteesiti DNA fragmendid, mis sisaldasid selektsiooniks markergeeni *HIS3* ja *taf14* või *sas5* N-terminaalset YEATS-domeeni kodeerivat järjestust. Sünteesitud DNA fragmendid transformeeriti tüvesse AKY2507, kus toimus *yaf9* geeni N-terminaalse osa (YEATS-domeeni) väljavahetus doonorjärjestuste vastu.

Transformatsiooni tulemusena valminud tüvedel on antud töö metsiktüüpi tüve AKY202 võrreldes hübriidse *yaf9* geeni ees *HIS3* markerjärjestus, *yaf9* geeni algusosa koos YEATS-domeeniga on välja vahetatud YEATS-domeeni kodeeriva *sas5* järjestusega (tüvi AKY2520) või *taf14* YEATS-domeeni kodeeriva järjestusega (tüvi AKY2521). Yaf9 kodeeriva ala lõpus asub Flag-epitooipi kodeeriv järjestus (3xFLAG-tag) ja *yaf9* geeni järel on *FBA1* terminaatorjärjestus ning *hghMX* (HGB) markerjärjestus. Hübriidse Yaf9 valgu ekspressiooni kontrolliti *Western blot* analüüsiga, mis andis mõlema tüve puhul positiivsed tulemused.

Edasist uurimistööd Yaf9 YEATS-domeeni funktsioonide uurimiseks saab viia läbi paralleelselt antud töö tulemusena konstrueeritud kahe tüvega AKY2520 (*Sas5* YEATS-domeeniga) ja tüvega AKY2521 (*Taf14* YEATS-domeeniga).

Edasiste katsete eesmärgiks oleks uurida, kuidas selline muundatud valk rakusiseseid protsesse võib mõjutada, näiteks kas ja kui palju on *SWR1* ja *NuA4* kompleksid, mille koosseisu Yaf9 kuulub, muutusest YEATS-domeeniga mõjutatud. Uurida tuleks ka seda, kas muteeritud Yaf9 seondub samade histooni „sabade“ sihtmärkidega nagu metsiktüüpi tüves või seondub hübriidne Yaf9 nüüd, vastavalt vahetatud YEATS-domeenile, valgu *Sas5* või *Taf14* sihtmärkidega. Uurimaks, kuidas need protsessid toimivad peale antud töös läbiviidud Yaf9 YEATS-domeeni vahetust, aitaks edendada arusaama Yaf9 YEATS-domeeni funktsioonist.

Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* model system to study the YEATS domain functions of the Yaf9 protein

Lennart Rikk

SUMMARY

Post-translational modification of histone "tails" can control the openness of chromatin in a particular region and thereby regulate transcription. To modify histone "tails", specialized proteins bind to domains that recognize an amino acid residue-based modification pattern on the "tail". One such domain is the YEATS domain, found in three proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: Yaf9, Taf14 and Sas5. The YEATS domain of Yaf9 is known to be involved in the regulation of transcription, but research on its precise function and mechanism of action has been restricted, because removal of the YEATS domain renders the Yaf9 protein unstable and it is no longer expressed at the normal levels.

The present work aimed to construct new strains of *S. cerevisiae* in which the coding sequence for the YEATS domain of the Yaf9 protein would be exchanged with the coding sequence for the YEATS domain of the Taf14 protein or the Sas5 protein and to check for the expression of the resulting hybrid proteins.

Antibodies were used to detect the expression of proteins, for this, a Flag epitope coding sequence (*3xFLAG-tag*) had to be added to the end of the *YAF9* coding sequence. This was done in the first stage of this project where two yeast strains with different marker genes, both based on the strain AKY202, were constructed in parallel: AKY2506 with the marker gene *natMX6* (NAT) and AKY2507 with the marker gene *hghMX* (HGB).

In the second stage, previously constructed strain AKY2507 together with plasmids pRS413_Taf14 and pRS413_Sas5 carrying the genes of *TAF14* and *SAS5* respectively, were

used. DNA fragments containing the sequence of the N-terminal (with YEATS domain) of the *taf14* or *sas5* proteins and also the *HIS3* marker gene for selection, were synthesized. The synthesized DNA fragments were transformed into the strain AKY2507, where the N-terminal portion of the *yaf9* gene (with YEATS domain) was exchanged with the donor sequences.

Compared to the wild-type strain AKY202, the transformed strains have the *HIS3* marker sequence in front of the hybrid *yaf9* gene, and the N-terminal side of the *yaf9* gene, with the YEATS domain, has been replaced with the *sas5* sequence encoding the YEATS domain (strain AKY2520) or with *taf14* YEATS sequence encoding the YEATS domain (strain AKY2521). At the end of the *yaf9* coding region is the Flag epitope coding sequence (*3xFLAG-tag*) and the *yaf9* gene is followed by *FBA1* terminator sequence along with the *hghMX* (HGB) marker gene sequence. Expression analysis of the newly created hybrid Yaf9 protein was performed with Western blot analysis, which gave positive results for both strains.

Further research to investigate the functions of the Yaf9 YEATS domain can be performed in parallel with the two strains created as the result of this work: AKY2520 (with the Sas5 YEATS domain) and AKY2521 (with the Taf14 YEATS domain).

The aim of further experiments should be to investigate how such a hybrid protein could affect intracellular processes. For example, whether and to what extent the SWR1 and NuA4 complexes, of which Yaf9 is a component of, are affected by the YEATS domain change. It should also be investigated whether the mutated Yaf9 binds to the same histone "tail" targets as the wild-type strain, or whether the hybrid Yaf9 now prefers the Sas5 or the Taf14 targets. Investigating how such processes work after the YEATS domain exchange would provide a better understanding of the function of the Yaf9 YEATS domain.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada enda juhendajat Kadri Peili, kes mind laboris kannatlikult koolitas, isegi kui ma rohkem kui ühe korra katsed sassi ajasin. Kes alati andis head nõu ja panustas enda abiga märkimisväärsel hulgal käesoleva töö valmimisse. Ning kes on panustanud ka antud töö väliselt minu teadlase karjääri arengusse. Sooviksin öelda ka tänusõnad juhendajale Arnold Kristjuhanile, kes mind kromatiini uurimisgruppi värbas, käesoleva tööga tõsiselt aitas ja kellega arutledes paljud asjad alati selgemaks said. Lisaks sooviksin sügavalt tänada ka Signe Värvi, kes oli laboris alati abivalmis mind aitama ning kelle juhendamise all antud töö valkude kontrollimise „ilupildid“ valmisid.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Ahmad, K., & Henikoff, S. (2002). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(suppl 4), 16477-16484.

doi.org/10.1073/pnas.172403699.

Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(5), 786.

dx.doi.org/10.1073/pnas.51.5.786.

Andrews, F. H., Shinsky, S. A., Shanle, E. K., Bridgers, J. B., Gest, A., Tsun, I. K., Krajewski, K., Shi, X., Strahl, B. D., & Kutateladze, T. G. (2016). The Taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nature chemical biology*, 12(6), 396–398.

doi.org/10.1038/nchembio.2065.

Andrews, F. H., Shinsky, S. A., Shanle, E. K., Bridgers, J. B., Gest, A., Tsun, I. K., ... & Kutateladze, T. G. (2016). The Taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nature chemical biology*, 12(6), 396-398. doi.org/10.1038/nchembio.2065.

Brennwald, P., & Rossi, G. (2007). Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS letters*, 581(11), 2119-2124.

doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.043.

Cairns, B. R., Henry, N. L., & Kornberg, R. D. (1996). TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Molecular and cellular biology*, 16(7), 3308-3316. doi.org/10.1128/MCB.16.7.3308.

Chittuluru, J. R., Chaban, Y., Monnet-Saksouk, J., Carrozza, M. J., Sapountzi, V., Selleck, W., Huang, J., Utley, R. T., Cramet, M., Allard, S., Cai, G., Workman, J. L., Fried, M. G., Tan, S., Côté, J., & Asturias, F. J. (2011). Structure and nucleosome interaction of the yeast NuA4 and Piccolo-NuA4 histone acetyltransferase complexes. *Nature structural & molecular biology*, 18(11), 1196–1203. doi.org/10.1038/nsmb.2128.

Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, 273-304. 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.
doi.org/10.1353/pbm.2015.0024.

Dunphy, W. G., Pfeffer, S. R., Clary, D. O., Wattenberg, B. W., Glick, B. S., & Rothman, J. E. (1986). Yeast and mammals utilize similar cytosolic components to drive protein transport through the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(6), 1622-1626. doi.org/10.1073/pnas.83.6.1622.

Feigerle, J. T., ja Weil, P. A. (2016). The C terminus of the RNA polymerase II transcription factor IID (TFIID) subunit Taf2 mediates stable association of subunit Taf14 into the yeast TFIID complex. *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22721-22740.
doi.org/10.1074/jbc.M116.751107.

Fischle, Wolfgang, Yanming Wang, and C. David Allis. "Histone and chromatin cross-talk." *Current opinion in cell biology* 15.2 (2003): 172-183. [doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00013-9).

Flemming, W. 1882. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. Leipzig : F.C.W. Vogel.
doi.org/10.5962/bhl.title.168645.

Furuyama, S., & Biggins, S. (2007). Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14706-14711. doi.org/10.1073/pnas.0706985104.

Gartenberg, M. R., & Smith, J. S. (2016). The nuts and bolts of transcriptionally silent chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203(4), 1563-1599.
doi.org/10.1534/genetics.112.145243.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.
doi.org/10.1126/science.274.5287.546.

Gowans, G. J., Bridgers, J. B., Zhang, J., Dronamraju, R., Burnetti, A., King, D. A., ... & Morrison, A. J. (2019). Recognition of histone crotonylation by Taf14 links metabolic state to gene expression. *Molecular cell*, 76(6), 909-921. doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.029.

- Gregoret, I., Lee, Y. M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology*, 338(1), 17-31. doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.006.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649), 349-352. doi.org/10.1038/38664.
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 33-64. doi.org/10.1534/genetics.111.134577.
- 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. doi.org/10.1042/cbi20120133.
- Henry, N. L., Campbell, A. M., Feaver, W. J., Poon, D., Weil, P. A., & Kornberg, R. D. (1994). TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes & Development*, 8(23), 2868-2878. doi.org/10.1101/gad.8.23.2868.
- Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931-945. doi.org/10.1038/nature03001.
- Jiang, G., Li, C., Lu, M., Lu, K., & Li, H. (2021). Protein lysine crotonylation: past, present, perspective. *Cell death & disease*, 12(7), 1-11. doi.org/10.1038/s41419-021-03987-z.
- John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R., & Workman, J. L. (2000). The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAFII30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)–FACT complex. *Genes & development*, 14(10), 1196-1208. doi.org/10.1101/gad.14.10.1196.
- Kabani, M., Michot, K., Boschiero, C., & Werner, M. (2005). Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(2), 398-403.
- Klein, B. J., Ahmad, S., Vann, K. R., Andrews, F. H., Mayo, Z. A., Bourriquen, G., ... 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. doi.org/10.1093/nar/gkx1151.

Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3), 285–294. [doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81958-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81958-3).

Kornberg, Roger D. "Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA: Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs." *Science* 184.4139 (1974): 868-871. doi.org/10.1126/science.184.4139.868.

Laurent, J. M., Garge, R. K., Teufel, A. I., Wilke, C. O., Kachroo, A. H., & Marcotte, E. M. (2020). Humanization of yeast genes with multiple human orthologs reveals functional divergence between paralogs. *PLoS biology*, 18(5), e3000627. dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3000627.

Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in genetics : TIG*, 32(1), 42–56. doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007.

Li, Y., Zhao, D., Chen, Z., & Li, H. (2017). YEATS domain: Linking histone crotonylation to gene regulation. *Transcription*, 8(1), 9-14. doi.org/10.1080/21541264.2016.1239602.

Lourenço de Freitas, N., Deberaldini, M. G., Gomes, D., Pavan, A. R., Sousa, Â., Dos Santos, J. L., & Soares, C. P. (2021). Histone deacetylase inhibitors as therapeutic interventions on cervical cancer induced by human papillomavirus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 1785.

Lu, P. Y., Levesque, N., & Kobor, M. S. (2009). NuA4 and SWR1-C: two chromatin-modifying complexes with overlapping functions and components. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(5), 799-815. doi.org/10.1139/O09-062.

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260. doi.org/10.1038/38444.

Martire, S., & Banaszynski, L. A. (2020). The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(9), 522–541. doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8.

- Mersman, D. P., Du, H. N., Fingerman, I. M., South, P. F., & Briggs, S. D. (2012). Charge-based interaction conserved within histone H3 lysine 4 (H3K4) methyltransferase complexes is needed for protein stability, histone methylation, and gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2652-2665. doi.org/10.1074/jbc.M111.280867.
- Millar, C. B., & Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(9), 657-666. doi.org/10.1038/nrm1986.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function*, 27(6), 421-429. doi.org/10.1247/csf.27.421.
- Morgan, D. O. 2007. Basic Chromatin Structure , p. 76. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press Ltd, London, UK.
- Müller, B., & Grossniklaus, U. (2010). Model organisms—a historical perspective. *Journal of proteomics*, 73(11), 2054-2063. doi.org/10.1016/j.jprot.2010.08.002.
- Patterton, H. G., Landel, C. C., Landsman, D., Peterson, C. L., & Simpson, R. T. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7268-7276. doi.org/10.1074/jbc.273.13.7268.
- Peil, K., Jürgens, H., Luige, J., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2020). Taf14 is required for the stabilization of transcription pre-initiation complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Epigenetics & chromatin*, 13(1), 1-11. doi.org/10.1186/s13072-020-00347-7.
- Remm, M., Storm, C. E., & Sonnhammer, E. L. (2001). Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *Journal of molecular biology*, 314(5), 1041-1052. doi.org/10.1006/jmbi.2000.5197.
- Ridgway, P., Maison, C., & Almouzni, G. (2002). Functional organization of the genome: chromatin. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electronic physician*, 9(1), 3592. [dx.doi.org/10.19082%2F3592](https://doi.org/10.19082%2F3592).
- Schulze, J. M., Kane, C. M., & Ruiz-Manzano, A. (2010). The YEATS domain of Taf14 in *Saccharomyces cerevisiae* has a negative impact on cell growth. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(4), 365-380. doi.org/10.1007/s00438-010-0523-x.

- 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. doi.org/10.1139/O08-111.
- Smith, M. G., & Snyder, M. (2006). Yeast as a model for human disease. *Current Protocols in Human Genetics*, 48(1), 15-6. doi.org/10.1002/0471142905.hg1506s48.
- Strathern, J. N., Klar, A. J., Hicks, J. B., Abraham, J. A., Ivy, J. M., Nasmyth, K. A., & McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell*, 31(1), 183-192. [doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90418-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90418-4).
- Sutton, A., Shia, W. J., Band, D., Kaufman, P. D., Osada, S., Workman, J. L., & Sternglanz, R. (2003). Sas4 and Sas5 are required for the histone acetyltransferase activity of Sas2 in the SAS complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16887-16892. doi.org/10.1074/jbc.M210709200.
- 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. doi.org/10.1128/MCB.24.21.9424-9436.2004.
- Zhang, H., Roberts, D. N., & Cairns, B. R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, 123(2), 219–231. doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.036.
- Zhang, W., Zhang, J., Zhang, X., Xu, C., & Tu, X. (2011). Solution structure of the Taf14 YEATS domain and its roles in cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 436(1), 83-90.
- Zhou, X., & Ma, H. (2008). Evolutionary history of histone demethylase families: distinct evolutionary patterns suggest functional divergence. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1-16. doi.org/10.1186/1471-2148-8-294.
- Talbert, P. B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausió, J., Berger, F., Bhalla, P. L., ... & Henikoff, S. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics & chromatin*, 5(1), 1-19. 04.2022.

- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., ... & Zhao, Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), 1016-1028. doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008.
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619-630. [doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90584-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90584-9).
- Tora, L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes & development*, 16(6), 673-675. doi.org/10.1101/gad.976402.
- Wan, J., Liu, H., Chu, J., & Zhang, H. (2019). Functions and mechanisms of lysine crotonylation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(11), 7163-7169. doi.org/10.1111/jcmm.14650.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, 138(5), 1019-1031. doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.049.
- Willhoft, O., Ghoneim, M., Lin, C. L., Chua, E., 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. doi.org/10.1126/science.aat7716.
- Winderickx, J., Delay, C., De Vos, A., Klinger, H., Pellens, K., Vanhelfmont, T., ... & Zabrocki, P. (2008). Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(7), 1381-1395.. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.020.
- Wu, R. S., Panusz, H. T., Hatch, C. L., & Bonner, W. M. (1986). Histones and their modification. *Critical Reviews in Biochemistry*, 20(2), 201-263. doi.org/10.3109/10409238609083735.
- Xu, E. Y., Kim, S., & Rivier, D. H. (1999). SAS4 and SAS5 are locus-specific regulators of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 153(1), 25-33. doi.org/10.1093/genetics/153.1.25.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/>. Külastatud 25.05.2022.

The Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/>. Külastatud 16.04.2022.

The.Yeasts. [https://theyeasts.org/page/YeastsSpecies table](https://theyeasts.org/page/YeastsSpecies_table). Külastatud 25.03.2022.

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerid ja nende järjestused. Väikeste tähtedega on tähistatud „sabaga“ praimerite plasmiidiga komplementaarsed järjestused.

Nimi	Järjestus
Yaf9_tag_F	5' TGAAGCAGAACTGGAAAACCTGGTAAAACAAGAAGCCATTAAC GGAAGTtctagaggggcggttcac 3'
Yaf9_tag_R	5' TGTATTACTATGGCTGTTATGAAAATACCGTTGTTCCGGGTGCAGT GATCcaggaaacagctatgaccatg 3'
pRS_yaf9_F	5' TAGATACATTACTTGTGACCACCTATTTACGGCATCACAAAGAAAG CGAGGcagattgtactgagagtgacc 3'
Taf14_YEATS_yaf9_R	5' ACTATTATGGTCTGTTGTATTCTGCTCATTTCCATTGTCGGAATTCG GTACaggaatctggataacgtgctc 3'
Sas5_YEATS_yaf9_R	5' ACTATTATGGTCTGTTGTATTCTGCTCATTTCCATTGTCGGAATTCG GTACcacaatcaacggtatagtgcaactg 3'
Yaf9-tag-ctrl	5' GAACTGACTGAAACAGGGTGGGG 3'
FBA1_ctrl_2	5' CGAACTCCAAAATGAGCTATC 3'
TAF14-C-term-CTRL	5' AAGGTTGGGGTGGATTCCT 3'
Sas5_Cterm_ctrl	5' CAAGGAAACCGGTTGGGGAGAG 3'

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lennart Rikk (sünnikuupäev 31.10.1985),

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

***Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemi loomine uurimaks
Yaf9 valgu YEATS-domeeni funktsioone,**

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.

Lennart Rikk

Tartus, 27.05.2022

(allkiri)