

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

Kristina Reinmets

**Histoonide H3 ja H4 mutatsioonide mõju RNA polümeraas II sõltuvale transkriptsioonile
pagaripärmis**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: *PhD* Arnold Kristjuhan

PhD Signe Värv

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Kromatiin.....	6
1.2 Histooidid.....	7
1.2.1 Histooidide variandid.....	7
1.3 Histooidide post-translatsioonilised modifikatsioonid.....	9
1.3.1 Histooidide atsetüleerimine.....	9
1.3.2 Histooidide metüleerimine.....	11
1.3.3 Muud histooidide modifikatsioonid.....	12
1.3.4 Histooidide modifikatsioonimustri muutus transkriptsiooni käigus.....	13
1.4 Valku kodeerivate geenide transkriptsioon.....	15
1.5 RNA polümeraas II.....	16
1.6 Rpb9 – RNA pol II subühik 9.....	18
1.6.1 Rpb9 roll iniitsiatsioonis.....	19
1.6.2 Rpb9 – transkriptsiooni elongatsioon ja selle täpsus.....	20
1.6.3 Rpb9 poolt vahendatud DNA reparatsioon.....	21
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1 Töö eesmärk.....	22
2.2 Materjalid ja meetodika.....	22
2.2.1 Kasutatud söötmed.....	22
2.2.2 Kasutatud tüved ja plasmiidid.....	23
2.2.3 Deletsioonitüve valmistamine.....	24
2.2.4 Mutantsete histooidide kombineerimine RPB9 deletsiooniga.....	27
2.2.5 3F12-epitoobiga märgistatud histooidide detekteerimine Western blot meetodiga.....	28
2.2.6 Kasvukiiruse mõõtmine.....	30
2.3 Tulemused.....	31
2.3.1 RPB9 deletsioon genoomist.....	31
2.3.2 Mutantsete histooidide transformatsioon <i>S. cerevisiae</i> rakkudesse.....	32
2.3.3 3F12-epitoobiga histooidi H3 detekteerimine Western blot meetodiga.....	32
2.3.4 Histooidimutatsioonide mõju kasvukiirusele.....	35
2.4 Arutelu.....	38
KOKKUVÕTE.....	40
SUMMARY.....	41
KIRJANDUSE LOETELU.....	43
LISAD.....	52
Lisa 1. Kasutatud pRS413 seeria plasmiidid (CEN, HIS3).....	52
Lisa 2. Kasutatud pärmitüvede tabel.....	53
TÄNUAVALDUSED.....	56
LIHTLITSENTS.....	57

KASUTATUD LÜHENDID

5 – FOA – *5-fluoroorotic acid*

6 – AU – 6-azauratsiil

ap – aluspaari

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

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

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

Cse4 – *chromosome segregation protein 4* (kromosoomi segregatsiooni valk 4)

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

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

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

H1 – histoon 1

H2A – histoon H2A

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H4 – histoon H4

HAT – *histone acetyltransferase* (histoonide atsetüültransferaas)

HDAC – *histone deacetylase* (histoonide deatsetülaas)

HRP – *horse radish peroxidase* (mädarõika peroksüdaas)

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

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

Nrd1 – *nuclear pre-mRNA down-regulation* (nukleaarse pre-mRNA allasurumise valk)

p – TEFb – *p*ositive *t*ranscription *e*longation *f*actor *b* (transkriptsiooni elongatsiooni soodustav faktor b)

PBS – *p*hosphate *b*uffered *s*aline (fosfaatpuhverdatud soolalahus)

PHD – *p*lant *h*omeo *d*omain (taimes avastatud valgumotiiv)

RNA pol II – RNA polümeraas II

Rpd3 – *r*educed *p*otassium *d*ependency (vähenenud kaaliumi vajadus), histoonide deatsetülaas

RSC – *r*emodels the *s*tructure of *c*hromatin (kromatiini struktuuri remodeleerija)

SAGA – *S*pt6-*A*da-*G*cn5-*a*cetyltransferase (Spt6, Ada ja Gcn5 subühikuid sisaldav atsetüültransferaas)

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

SUMO – *s*mall *u*biquitin-like *m*odifier (väike ubikvitiinisarnane modifitseerija)

TAF – *T*BP-*a*ssociated *f*actors (TBP-ga seonduvad faktorid)

TBP – *T*ATA-binding protein (TATA)

TFIID – *t*ranscription factor *I*ID (transkriptsioonifaktor IID)

Tudor – valgumotiiv, avastatud *Drosophila* Tudor valgus

UAS – *u*pstream *a*ctivating *s*equence (ülesvoolu aktiveeriv järjestus)

Zn1, Zn2 – tsinki siduvad domeenid 1 ja 2

SISSEJUHATUS

Geneetilise informatsiooni säilitamine, selle avaldumise regulatsioon ja kaitsmine kahjulike tegurite eest on väga oluline iga elusorganismi jaoks. Päristuumsete ehk eukarüootsete rakkude genomne DNA on selle eesmärgiga pakitud ja organiseeritud erinevate valkude abil raku tuuma. Tuumas paiknevat DNA ja valkude kompleksit nimetatakse kromatiiniks, mille põhiliseks struktuurseks kordusüksuseks on nukleosoom. Nukleosoomi moodustavad aluselised histoonivalgud H2A, H2B, H3 ja H4 ning nende ümber keerdunud 147 aluspaari DNA-d. Nagu enamikule rakus sünteesitud valkudest, lisatakse ka histoonidele post-translatsiooniliselt erinevaid keemilisi rühmi. Histoonidel on teada vähemalt kaheksa post-translatsioonilist modifikatsiooni, mis mõjutavad kromatiini üldist seisundit ja DNA kättesaadavust või on vajalikud teiste valkude kromatiinile toomiseks.

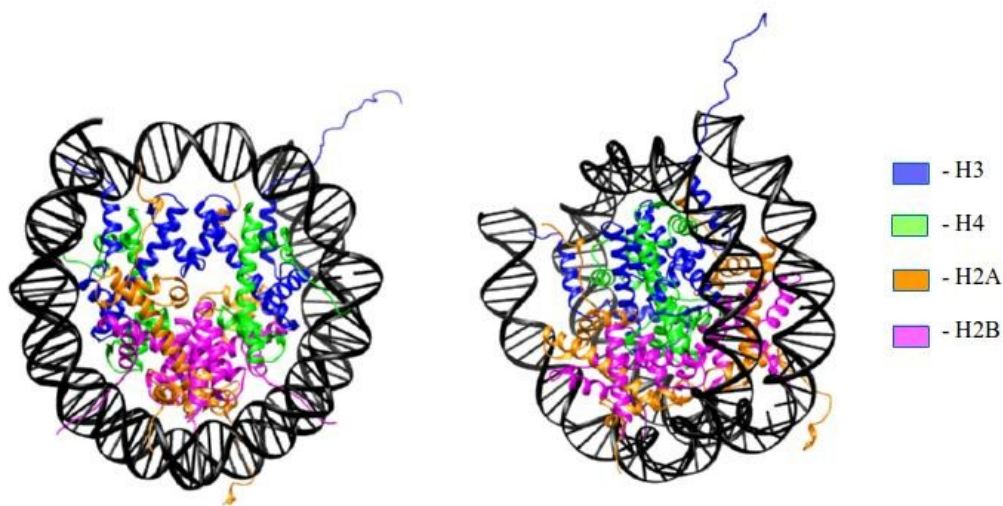
Histoonid, olles seotud DNA-ga, osalevad paratamatult sellistes molekulaarsetes protsessides nagu DNA replikatsioon ja reparatsioon, transkriptsioon, rekombinatsioon jt. Suurem osa histoonide modifikatsioone puudutavast informatsioonist pärineb uurimustöödest, milledes on mudelorganismina kasutatud pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*). Histoonide modifikatsioonid on olnud tähelepanu keskpunktis ligi viisteist aastat peamiselt oma tähtsuse tõttu geeniekspressiooni regulatsioonis, olles seetõttu ahvatlevaks ravimite sihtmärgiks. Nende aastate jooksul on leitud palju seoseid histoonide modifikatsioonide ja transkriptsiooni regulatsiooni vahel, aga paljud küsimused on veel vastusteta. Üks sellistest küsimustest on mRNA-d sünteesiva RNA polümeraas II roll histoonimodifikatsioonide ära tundmises ja kui suur on polümeraasi sõltumatus teistest histoonimodifikatsioonide „lugevatest” faktoritest kromatiinil opereerimisel.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade kromatiini struktuurist, histoonide post-translatsioonilistest modifikatsioonidest ning nende seosest transkriptsiooniga. Tutvustatakse transkriptsiooni ja seda, kuidas selles osaleb RNA polümeraas II subühik Rpb9. Töö eksperimentaalses osas näidatakse histoonide modifitseeritavate aminohapete muteerimise mõju *rpb9* deletsiooniga *Saccharomyces cerevisiae* rakkude kasvukiirusele.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kromatiin

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



Joonis 1. Nukleosoomi struktuur. DNA on kujutatud musta kaksikheeliksina, mis on keritud ümber struktuuri keskel paiknevate histoonide. Joonisel on näha histoonide N-terminaalsete sabade välja ulatumist nukleosoomist. Joonise tegemiseks on kasutatud struktuuri PDB ID: 1AOI (Luger 1997).

Nukleosoomid ja nende vahele jääv DNA moodustavad eukarüootse genoomi pakkimise esimese taseme, mida nimetatakse „pärlikee” struktuuriks (ingl. k. „*beads on a string*”) (Olins ja Olins 1974). Järgmiseks kromatiini kondenseerumise tasemeks on 30 nm fiiber, mille kirjeldamiseks on välja pakutud solenoid-struktuur ja siksak-struktuur. Solenoidi struktuuris paiknevad nukleosoomid kõrvuti, keerdudes vasakukäeliseks heeliksiks ja painutades *linker* DNA-d (Widom ja Klug 1985). Siksak-struktuuri kohaselt moodustub samuti vasakukäeline heeliks, aga nukleosoomid on ühendatud sirge *linker* DNA-ga ja paiknevad vastakuti (Schalch et al., 2005; Williams et al., 1986; Woodcock et al., 1984). Mitoosis kondenseerub kromatiin erinevate lisavalkude abil kromosoomideks.

1.2 Histoonid

Histoonid on kõrgelt konserveerunud aluselised valgud, mille iseloomulikud histooni voldi domeenid (ingl. k. *histone fold domain*) on olulised nii valk-DNA kui ka histoonidevahelisteks interaktsioonideks. Histoonide C-terminust nimetatakse struktuursetel põhjustel valgu „kehaks” ning N-terminust „sabaks”. Histoonide „kehad” on kindla struktuuriga ning moodustavad nukleosoomi südamiku, mis seob ja painutab DNA-d. Histoonide N-terminaalsed „sabad” on aga struktureeritud ja ulatuvad nukleosoomist väljapoole, osaledes nukleosoomidevahelistes interaktsioonides (Luger et al., 1997). Histoonide struktuuri tähtsust DNA sidumisel näitab ka see, et üheksa kolmeteistkümnest transkriptsioonifaktori TFIID koosseisu kuuluvatest TAF valkudest sisaldavad histooni voldi domeeni (Gangloff et al., 2001). Arvatavasti konkureerivad TAF valgud histoonidega DNA sidumises. See etapp on oluline transkriptsiooni pre-initsiatsiooni kompleksi moodustumisel.

1.2.1 Histoonide variandid

Lisaks neljale kanoonilisele histoonile (H2A, H2B, H3 ja H4), esinevad eukarüootses kromatiinis spetsiifilised histoonide variandid, mis on vajalikud kindlates genoomi piirkondades või

asendavad kanoonilisi histoonide ajutiselt, kaitudes näo. signaalhistoonina. Histoonide variandid on olulised sellistes protsessides nagu näiteks transkriptsiooni initsiatsioon ja terminatsioon, DNA vigade parandamine, kromosoomide lahknemine ja meiosis toimuv rekombinatsioon (Talbert ja Henikoff 2010).

Tsentromeersel aladel asendatakse histooni H3 spetsiaalse variandiga, mida inimestes tuntakse kui CENP-A-d. Pagaripärmil on aga tsentromeerseks H3 variandiks Cse4 (*chromosome segregation protein 4*). Tsentromeerseid histoonide sisaldavad nukleosoomid painutavad DNA-d kanooniliste histoonidega nukleosoomist erinevalt, põhjustades positiivse superspiralisatsiooni. DNA positiivne superspiralisatsioon tsentromeeridel viib asümmeetrilise kromosoomipinna moodustumiseni, mis on oluline kinetohoori moodustumiseks mitootilisel segregatsioonil (Furuyama ja Henikoff 2009).

Kõrgemates eukarüootides on lisaks kanoonilisele ja tsentromeersele histoonile H3 veel üks variant, H3.3, mida pagaripärmis nimetataksegi H3-ks. Histooni H3.3 seostatakse aktiivse kromatiiniga ning arvatakse, et replikatsiooni käigus nukleosoomi paigutatud H3 asendatakse H3.3-ga transkriptsioonijärgselt (Ahmad ja Henikoff 2002).

Histoonil H2A on samuti olemas mittekanoonilised variandid, millest kaks kõige levinumat on H2A.Z ja H2A.X. Pärmis esineb lisaks H2A-le histoon Htz1, mis on H2A.Z homoloog. Histoonil H2A.Z on leitud atsetüleerimist ja ubikvitineerimist, mis seletab selle histooni mitmekesiseid ülesandeid. Kuna H2A.Z esineb promootoritel ja nukleosoomides, mis külgnevad nukleosoomivabade aladega, osaleb see arvatavasti RNA polümeraas II transkriptsiooni initsiatsioonil (Adam et al., 2001). H2A.Z osaleb geeniekspressiooni regulatsioonis, DNA reparatsioonis, aga ka kromatiini remodeleerimisel ja heterokromatiini moodustumisel (Altaf et al., 2009). Histoon H2A.X on oluline DNA reparatsioonis, kuna selle fosforüleerimine toimub vastusena DNA kaheaahelalistele katketele, mis aitab kohale tuua reparatsiooniks vajalikud valgud (Altaf et al. 2009; van Attikum ja Gasser 2009).

1.3 Histoone post-translatsioonilised modifikatsioonid

Histoone, nagu ka kõiki teisi rakus sünteesitavaid valke, on võimalik modifitseerida, lisades aminohapete külghelatele keemilisi rühmi või polüpeptiide (näiteks 76-aminohappelist valku ubikvitiini). Valkude post-translatsiooniliste modifikatsioonide abil on võimalik reguleerida nende aktiivsuse spetsiifikat ja lokalisatsiooni, laiendades selliselt nende funktsionaalsuse spektrit (Prabakaran et al., 2012). Histoone, olles otseses kontaktis DNA-ga, osalevad nii geeniekspressiooni regulatsioonis, DNA replikatsioonis, reparatsioonis kui ka genoomi pakkimisel ja õigel jaotamisel tütarakkude vahel. Kõik see on võimalik läbi histoone post-translatsiooniliste modifikatsioonide, mis eeskätt reguleerivad histoon-DNA interaktsioonide tugevust ja erinevate faktorite ligipääsu DNA-le.

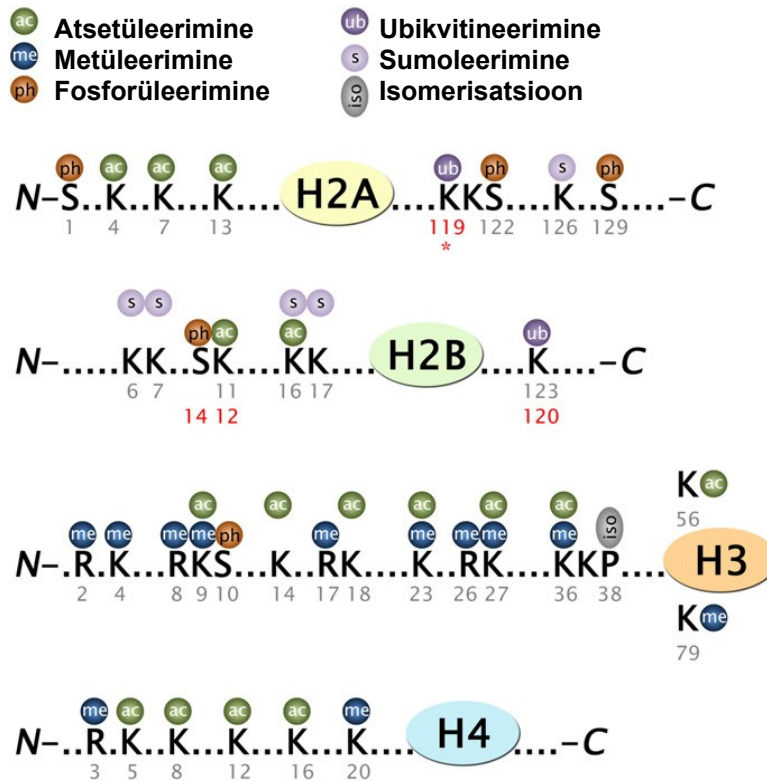
Nagu eespool mainitud, ulatuvad histoone N-terminaalsed otsad nukleosoomist väljapoole, olles heaks sihtmärgiks modifikatsioonidele. Histoone H3 aga modifitseeritakse ka selle "kehalt", histoone H2A ja H2B alluvad modifitseerimisele ka C-terminaalsed otsad. Järgnevalt käsitlem lähemalt levinumaid histoone modifikatsioone.

1.3.1 Histoone atsetüleerimine

Histoone atsetüleerimine oli esimene kirjeldatud histoone modifikatsioon (Phillips 1963). Atsetüleerimise käigus lisatakse atsetüülrühm lüsiini külghelale, neutraliseerides selle positiivse laengu, mis nõrgestab nii histoone interaktsioone DNA-ga kui ka nukleosoomide vahelist kontakti (Lee et al. 1993; Wang ja Hayes 2008). Selle interaktsioone nõrgestava efekti tõttu seostatakse histoone atsetüleerimist üldiselt transkriptsiooni aktivatsiooniga. Atsetüleeritud histoone destabiliseerivad nukleosoomi, mis võimaldab kromatiini remodeleerimist ja DNA-ga seonduvate faktorite ligipääsu. Kromatiini remodeleerijad seonduvad tihti ka otseselt atsetüülrühmaga märgistatud histoonega läbi bromodomeeni (Nagy ja Tora 2007; Carrozza et al. 2003; Mujtaba et al. 2007). Histoone atsetüleerimist viivad läbi valgulised kompleksid, mida nimetatakse HAT-deks (*histone acetyltransferase*). Viimasel ajal on neid hakatud nimetama ka

KAT-deks, atsetüülrühma lisamise tõttu lüsiinjääkidele. HAT-de spetsiifika varieerub ja enamuse atsetüültransferaase modifitseerivad mitmeid aminohappejääke, aga oluliseks peetakse teiste modifikatsioonide konteksti (Lee ja Workman 2007). Näiteks NuA3 atsetüültransferaas atsetüleerib H3K14 ning vajab selleks H3K4me3 modifikatsiooni olemasolu (Smart et al., 2009). SAGA kompleksi kuuluv katalüütilise aktiivsusega atsetüültransferaas Gcn5 sisaldab ka bromodomeeni, mis on vajalik atsetüleeritud lüsiinide äratundmiseks (Hassan et al., 2002). Gcn5 on ka väga laia spetsiifikaga, atsetüleerides H3 lüsiine K9, K14, K18, K23 ja K36 (Grant et al. 1999; Lee ja Workman 2007; Fuchs et al. 2009). See näitab, kuidas kromatiinil töötavad valgud on omavahel pidevas suhtluses ning ühe kompleksi töö on signaaliks järgmisele, põhjustades dünaamilise ja hästi reguleeritud sündmuste kaskaadi.

Atsetüleerimine on kõige levinum modifikatsioon, esinedes kõigil neljal histoonil (Joonis 2). Vastsünteesitud histooni H4 atsetüleeritakse lüsiinidel K5 ja K12, värskel H3-l aga lüsiini K56. Need H3 ja H4 atsetüleerimised on vajalikud nukleosoomi moodustamiseks ja eemaldatakse koheselt pärast nende lülitamist kromatiini (Sobel et al., 1995). Atsetüleeritud H3K14 on seondumismärgiks kromatiini remodeleerijale RSC (*remodels the structure of chromatin*), mis osaleb geeniaktivatsioonis (Kasten et al., 2004). Hiljuti näidati, et RSC kompleksi kromatiinile toomine läbi H3K14 atsetüleerimise on vajalik ka DNA reparatsiooniks (Duan ja Smerdon 2014). Atsetüleerimise tähtsust näitavad ka katsed, milles histooni H4 nelja atsetüleeritava lüsiini muteerimisel ei ole pärmi rakud enam eluvõimelised (Megee et al., Smith, 1990).



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

1.3.2 Histonide metüleerimine

Metüleerimine on veidi keerulisem modifikatsioon kui atsetüleerimine kahel põhjusel: esiteks, metüleerida on võimalik nii lüsiini kui arginiini ja teiseks, metüülrühmi on võimalik lüsiini külghelale lisada kolm ning arginiinile kaks (Bedford ja Richard 2005). Metüülrühmade lisamine ei muuda histoonide laengut, aga sarnaselt atsetüülrühmadele on metüleeritud lüsiinid ja arginiinid seondumiskohtadeks erinevatele valkudele. Metüleerimist viivad läbi metüültransferaasid, mille põhiline erinevus HAT-dest on suurem spetsiifika. Näiteks H3K4 metüültransferaasiks on Set1, H3K36-l Set2 ning H3K79-l Dot1. Metüleeritud lüsiini tunnevad

ära valgud, mis sisaldavad kromo-, PHD- ja Tudor-domeeni, metüleeritud arginiin on aga sihtmärgiks ainult Tudor-domeeni sisaldavatele valkudele (Huang et al. 2006; Côté ja Richard 2005; Jacobs ja Khorasanizadeh 2002; Li et al. 2006).

Histoonide metüleerimise mustri keerukus viitab ka protsesside rohkusele, mida rakus metüleerimise abil reguleeritakse. H3K4me3 (me3 - trimetüleerimine) esineb geenide promotoralal, H3K36me (monometüleerimine) on leitud aga geenide kodeerivalt alalt (C. L. Liu et al., 2005; Vezzoli et al., 2010). Samas on H3K4 monometüleerimine seotud hoopis geeniekspressiooni vaigistamisega (Briggs et al., 2001). Toodud näited illustreerivad seda, kuidas ühe ja sama aminohappe modifitseerimisel on erinevad tagajärjed olenevalt metüleerimise tasemest.

1.3.3 Muud histoonide modifikatsioonid

Vaatamata üldiselt palju levinud valkude fosforüleerimisele, esineb seda modifikatsiooni histoonidel suhteliselt vähe (Joonis 2). Fosforüleerida on võimalik seriini-, türosiini- ja treoniinijääke. Arvatavasti toimub histoonide fosforüleerimine vastusena väliskeskkonna tingimuste muutusele. Näiteks süsinikuallika vahetusel kasvukeskkonnas fosforüleeritakse H3S10 (seriin 10), mis mõjutab H3K14 atsetüleerimist ja sellega ka vajalike geenide transkriptsiooni aktivatsiooni (Lo et al., 2001). Samuti on näidatud, et histooni H2A C-terminuse ja H4S1 fosforüleerimine on oluline DNA kahjustuste parandamiseks (Cheung et al., 2005; Downs et al., 2000).

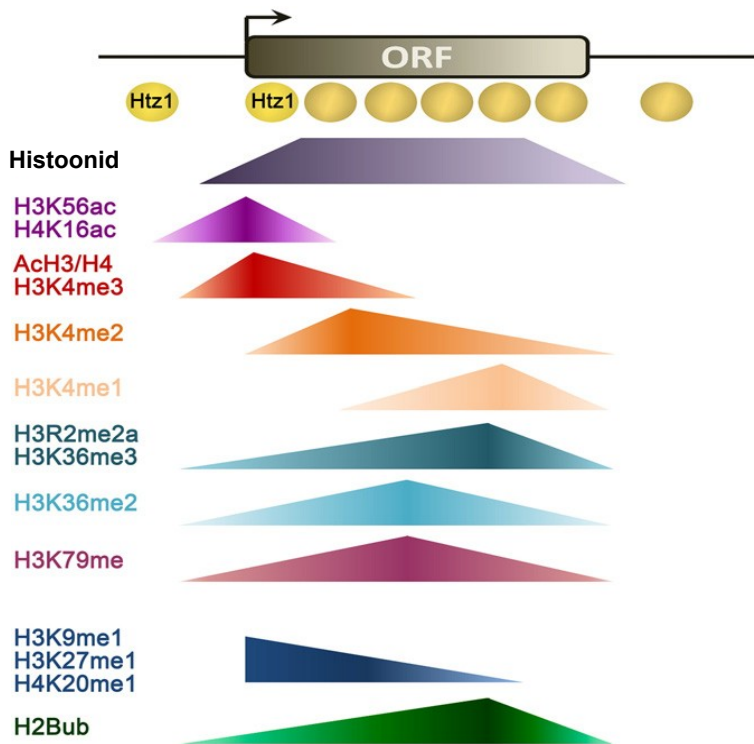
Histoonidele on võimalik lisada ka suuremaid molekule nagu ubikvitiin (76 aminohapet) ja SUMO valgud (SUMO = *small ubiquitin-like modifier*). Ubikvitineerimine osaleb valk-valk interaktsioonides ja valkude destabiliseerimises. Pagaripärmis on leitud ubikvitineerimist histooni H2B lüsiinil K123 (Robzyk, Recht, & Osley, 2000). On näidatud, et ubikvitineerimine on vajalik kromatiini remodeleerijate kohaletoomiseks, hõlbustades transkriptsiooni elongatsiooni (Pavri et al., 2006). Informatsiooni histoonide sumoleerimise ja selle rolli kohta on väga vähe. Arvatakse, et SUMO-rühmade lisamisel võib olla transkriptsiooni repressiiv roll (Nathan et al., 2006).

Lisaks juba mainitud modifikatsioonidele esinevad histoonidel veel ka ADP-ribosüleerimine, proliini isomerisatsioon ja deimineerimise protsess, mille käigus muudetakse arginiin tsitrulliiniks. Arvatakse, et deimineerimisel on arginiini metüleerimise aktiveerivale toimele supresseeriv efekt, sest tsitrulliini moodustumine takistab metüleerimist (Cuthbert et al., 2004). Proliini konformatsiooni muutus isomerisatsiooni käigus mõjutab oluliselt valgusstruktuuri ning näiteks H3K36 metüleerimiseks on vajalik õige H3P38 konformatsioon (trans-konformatsioon) (Nelson et al., 2006). Histoonide ADP-ribosüleerimine on suhteliselt vähe kirjeldatud modifikatsioon ja kuigi seda modifikatsiooni läbi viivaid ensüüme seostatakse transkriptsiooniga, konkreetsed tõendid selle kohta siiski puuduvad (Kouzarides, 2007).

1.3.4 Histoonide modifikatsioonimustri muutus transkriptsiooni käigus

Histoonide modifikatsioonid ei erine mitte ainult aktiivse ja vaigistatud kromatiini vahel, vaid ka ekspresseeritava geeni siseselt, muutudes koos RNA polümeraasi elongatsiooniga kooderiva ala 3' suunas (Joonis 3). Nagu eespool mainitud, seostatakse histoonide atsetüleerimist üldiselt avatud kromatiiniga, milles DNA-nukleosoomi vaheline kontakt on nõrgestatud (Wang ja Hayes 2008). Sellele vastavalt on ka näidatud, et transkribeeritavatel geenidel ja nende promootoraladel on histoonide H3 ja H4 üldine atsetüleerituse tase suurenenud. Aktiivsed promootorid ja kooderiva ala 5' regioonid on märgistatud H3K4me3-ga (Pokholok et al., 2005). H3K4me2 esineb kogu lugemisraami ulatuses ning H3K4me1 on leitud geeni 3' otsas (C. L. Liu et al., 2005). H3K36 di- ja trimetüleerimine esineb geenide kehal ja 3' otses ja vaatamata sellele, et H3K36 metüleerimist seostatakse üldiselt aktiivselt transkribeeritavate geenidega, on selle sisuline toime kromatiinile hoopis represseeriv. Nimelt on H3K36 di- ja trimetüleerimine signaaliks histoonide H3 ja H4 deatsetüleerimiseks pärast RNA pol II möödumist, sest metüleeritud H3K36-ga seondub Rpd3 deatsetülaas ja histoonidel olevad atsetüülrühmad eemaldatakse (Carrozza et al., 2005; Keogh et al., 2005). H3R2me2a asümmeetriline dimetüleerimine takistab H3K4 trimetüleerimist, mis nagu eespool mainitud, on promootoralade märgiseks ning seetõttu on H3R2me2a levinud geenide keskpaigas ja 3' otsas (Guccione et al., 2007; Kirmizis et al., 2007). H3K79 metüleerimise tähtsust on näidatud DNA reparatsioonil ja rakutsükli regulatsioonis, aga

teadmised selle seosest transkriptsiooniga on puudulikud ning vajavad põhjalikkumat uurimist. Üldiselt seostatakse H3K79 metüleerimist eukromatiiniga, kuna selle modifikatsiooni levik on laialdane (Ng et al., 2003). Üheks huvitavaks modifikatsiooniks on histooni H2BK123 ubikvitineerimine (Joonisel 3 lihtsalt H2Bub), mis esineb nii promotoraladel kui ka lugemisraami siseselt (Batta et al., 2011; Shieh et al., 2011). H2B ubikvitineerimine on seotud elongeeruva RNA pol II-ga ning on vajalik H3K4 di- ja trimetüleerimiseks (Robzyk et al., 2000; Wood et al., 2003; Xiao et al., 2005). Samuti on näidatud, et H2Bub takistab kromatiini kõrgemat järku struktuuri moodustumist, olles selles sarnane H4K16 atsetüleerimisele ning on vajalik ka nukleosoomide taasmoodustumiseks pärast polümeraasi möödumist (Fierz et al., 2011; Fleming, Kao et al., 2008).



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

1.4 Valku kodeerivate geenide transkriptsioon

Transkriptsiooniks nimetatakse protsessi, mille käigus sünteesitakse DNA ühele ahelale komplementaarne üheaahelaline RNA molekul, milles tümiin (T) on asendatud uratsiiliga (U). Eukarüootses rakus sünteesib valku kodeerivat mRNA-d RNA polümeraas II. Transkriptsiooni saab jagada kolmeks etapiks- initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Initsiatsioon algab preinitsiatsiooni kompleksi moodustumisega promootoril. Promootori all mõeldakse tavaliselt DNA piirkonda, mis on vajalik transkriptsiooni algatamiseks. Eukarüootsed promootorid koosnevad üldiselt nn. „core” elemendist (mis sisaldab või asub transkriptsiooni alguskoha vahetus läheduses) ja reguloorsetest elementidest. Reguloorseid elemente tuntakse mitu – TATA (AT-rikas ala) element, Inr (ingl. k. *initiator*), BRE (ingl. k. *TFIIB recognition element*), DPE (ingl. k. *downstream promoter element*) ja MTE (ingl. k. *motif ten element*) element (Kadonaga 2012). Eukarüootsed promootorid ja nende elementide kompositsioon võivad olla väga erinevad. Vaatamata sellele, et TATA-elementi sisaldavaid promootoreid on eukarüootsetes rakkudes umbes 20%, on just nendelt promootoritelt toimuvat initsiatsiooni uuritud kõige rohkem.

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

Pärast polümeraasi vabanemist, toimub promootori läheduses seiskumine (paus), mida peetakse elongatsiooni protsessis kriitiliseks etapiks. RNA pol II saab nendest pausidest üle kasutades oma

võimet liikuda 3' – 5' suunas või võib vajada TFIIS-i abi RNA 3'-OH otsa paigutamisel aktiivtsentrisse (Saunders et al., 2006). Produktiivseks elongatsiooniks on vajalik selliste faktorite osalemine nagu NELF, DSIF, P-TEFb, TFIIF ja TFIIS. Suure tähtsusega on elongatsiooni reguleerimine läbi CTD kordusjärjestuste fosforüleerimise (Saunders et al., 2006; Yamada et al., 2006).

Transkriptsiooni terminatsioon saab toimuda kahe mehhanismi kaudu – polü-A järjestusest või Nrd1 kompleksist sõltuv mehhanism. Polümeraasi valmistamiseks järgmiseks transkriptsiooni tsükliks on vajalik ka CTD defosforüleerimine, mis võimaldab polümeraasi toomise promootorile (Mischo ja Proudfoot 2013; Hanes 2014).

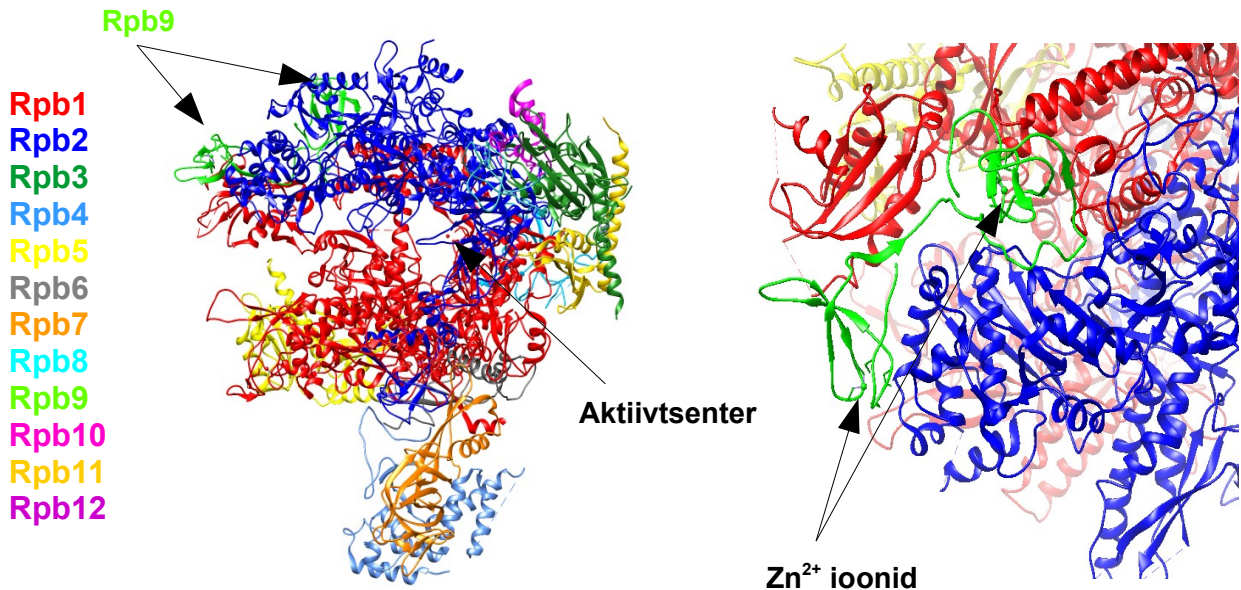
1.5 RNA polümeraas II

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

Struktuurselt koosneb RNA pol II neljast mobiilsest elemendist, mida nimetatakse inglise keeles *core*, *clamp*, *shelf* ja *jaw lobe*. *Core* element ehk polümeraasi südamik koosneb subühikutest Rpb1-3 ja Rpb10-12, millest Rpb1 ja Rpb2 moodustavad aktiivtsentri (Joonis 4). Polümeraasi keskel on sügav lõhe, mille kaudu siseneb DNA aktiivtsentrisse. Lõhe on moodustatud kõigi nelja elemendi poolt ja on näidatud nii selle avatud kui suletud konformatsiooni. *Shelf* ja *jaw lobe* ehk “riiul” ja polümeraasi “lõua” osa on suhteliselt vähe mobiilsed, aga on võimelised pöörlema paralleelselt aktiivtsentriga. *Clamp* ehk “klamber” on ühendatud polümeraasi südamikuga

paindlikke motiividega ja saab liikuda kuni 30 Å avades ja sulgedes lõhet. Nagu eespool mainitud, moodustavad Rpb4 ja Rpb7 dimeerse kompleksi, mis on võimeline ülejäänud polümeraasist dissotsieeruma. Rpb4/7 kompleks on vajalik RNA pol II avatud kompleksi moodustumiseks transkriptsiooni initsiatsioonil. On näidatud, et Rpb4/7 osaleb raku elu pikkuse reguleermises läbi mRNA lagundamise. Samuti arvatakse, et see kahesubühikuline kompleks osaleb translatsiooni initsiatsioonis ja 3'-otsa protsessivate faktorite toomises polümeraasile (Duan et al., 2013; Hahn, 2004; Harel-Sharvit et al., 2010; Runner et al., 2008).

Transkriptsiooni tsükli jooksul toimub RNA pol II fosforüleerimine ja defosforüleerimine. See modifitseerimine toimub Rpb1 CTD-1, mis koosneb YSPTSPS kordustest. Neid seitsme aminohappe kordusi esineb eukarüootides 25-52, pagaripärmis näiteks 26 ja inimeses 52 kordust. Fosforüleerida saab Ser2, Ser5, Ser7 ja Thr4-ja ning vastavalt saadud modifitseerimise mustriks on CTD seondumiskohaks faktoritele, mis on vajalikud initsiatsiooniks, elongatsiooniks, terminatsiooniks ja mRNA protsessimiseks. Nagu eespool mainitud, preinitsiatsiooni kompleksi moodustumiseks peab CTD olema defosforüleeritud. Promootorilt vabanemiseks on vajalik aga Ser2 fosforüleerimine, elongatsiooni käigus fosforüleeritakse ka Ser5 ning polümeraasi vabanemiseks DNA-lt tuleb CTD uuesti defosforüleerida (Hahn 2004; Hsin ja Manley 2012).



Joonis 4. RNA polümeraas II struktuur. Vasakpoolsel struktuuril on kujutatud RNA pol II külgsuunas. Nooltega on näidatud Mg²⁺ sisaldav aktiivtsenter ja Rpb9 asukoht. Parempoolsel struktuuril on näidatud lähemalt Rpb9 asukohta polümeraasil ülevalt vaadates ning nooltega on märgitud Zn²⁺ioonid Rpb9 Zn-siduvates domeenides. Joonise tegemiseks on kasutatud struktuuri PDB ID: 3FKI (Meyer et al., 2009).

1.6 Rpb9 – RNA pol II subühik 9

Rpb9 on 122-st aminohappest koosnev 14 kDa valk, mis seondub polümeraasi “lõuale” ja kontakteerub polümeraasi kahe suurima subühikuga Rpb1 ja Rpb2 (Joonis 4). Rpb9 on kõrgelt konserveerunud ning on näidatud, et inimese Rpb9 on võimeline taastama pärmi Rpb9 deletsiooniga RNA pol II funktsionaalsust (McKune et al., 1995). Rpb9 koosneb kahest tsinki siduvast domeenist – N-terminaalne Zn1 ja C-terminaalne Zn2 domeen ning neid ühendavast struktuuritust *linker*-ist. Tsingi ionide sidumise eest vastutavad tsüsteiinid (Cys) N-terminaalses domeenis positsioonides 7, 10, 29 ja 32 ning C-terminaalses domeenis positsioonides 75, 78, 103 ja 106. Zn1 ja Zn2 domeenid sisaldavad β-lehti, kumbki kontakteerub kas Rpb1 või Rpb2-ga (Liu

et al., 2011). Rpb9 deletsioon ei ole pärmis letaalne, aga põhjustab mitmeid defekte nagu rakkude aeglane kasv optimaalsetes tingimustes, temperatuuri- ja UV-tundlikkus, elongatsiooni inhibeerivate kemikaalide tundlikkus (nt 6-azauratsiil, mükofenoolhape) ja aeglane spooride idanemine (Desmoucelles et al., 2002; Dudley et al., 2005; Furter-Graves et al., 1994; Gibney et al., 2008; Woychik et al., 1991). Vaatamata oma suhteliselt väikesele molekulmassile, on Rpb9-l kirjeldatud mitmeid raku elutegevuseks olulisi funktsioone. Avaldatud tulemused valgustruktuuri ja funktsiooni seoste kohta on kohati vastuolulised, aga üks on selge – Rpb9 osaleb mitme olulise molekulaarse protsessi reguleerimises ja selle valgustruktuuri kirjeldamine on suure tähtsusega.

1.6.1 Rpb9 roll initsiatsioonil

Transkriptsiooni alguskoha täpsus on oluline funktsionaalsete mRNA-de sünteesiks. Teadaolevalt algab initsiatsioon TBP seondumisega TATA-elementile (või muule reguleerivale elementile), mis toob kohale teised vajalikud faktorid. Seega, vaatamata sellele, et TBP seondumine TATA-elementidele vastutab polümeraasi üldise positsioneerimise eest, transkriptsiooni initsiatsiooni koha määravad siiski RNA pol II ise ja TFIIB (Furter-Graves et al., 1994; Li et al., 1994). Pagaripärmis algab transkriptsioon tavaliselt 40 – 120 aluspaari TATA-elementist edasi DNA ahela 3' suunas, vastavalt promotori eripärale. Rpb9 Δ rakkudes aga kasutab polümeraas lisaks normaalsetele alguskohtadele alternatiivseid, TATA-elementide lähedal asuvaid järjestusi. Sama efekt on ka kahel Rpb9 mutatsioonil, millest üks on Cys7 asendus Phe-ks Zn1 domeenis ning teine mutatsioon on selline, mis põhjustab initsiatsiooni alguskoha nihkumist, on varajane stop-koodon 111-s positsioonis. Defektse või puuduva Rpb9-ga polümeraasi initsiatsiooni alguskoha nihkumist on näidatud nii *in vivo* kui *in vitro*, kasutades erinevate geenide promotoreid. See näitab, et Rpb9 osaleb RNA pol II positsioneerimisel TATA-elementi suhtes ja on vajalik transkriptsiooni initsiatsiooniks optimaalsetest kohtadest (Furter-Graves et al., 1991; Furter-Graves et al., 1994; Hull et al., 1995; Sun et al., 1996). Kuna mutatsioon Rpb9 Zn1 domeenis põhjustab samade alternatiivsete transkriptsiooni alguskohtade kasutamist, mis Rpb9 deletsioongi ning C-terminuse lõikamine põhjustab samuti initsiatsiooni koha nihet, võiks arvata, et selle funktsiooni omistamine valgustruktuuri konkreetsele piirkonnale on raskendatud. Hilisemad komplementatsiooni katsed on aga näitanud, et plasmiidilt ekspresseeritud Rpb9 Zn1 domeen on

võimeline taastama *rpb9Δ* rakkude normaalset initsiatsioonimustrit (Hemming et al., 2000).

1.6.2 Rpb9 – transkriptsiooni elongatsioon ja selle täpsus

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

On näidatud, et *rpb9Δ* rakkudes sünteesitud transkriptides esinevad valesti sisestatud nukleotiidid tihedamini, kui normaalse polümeraasi poolt sünteesitutes. Samade katsete raames näidati ka, et elongatsioonifaktori TFIIS deletsioon mõjutab transkriptsiooni täpsust vähemal määral kui Rpb9 Δ (Nesser et al., 2006). Autorid pakkusid välja kolm võimalikku viisi, kuidas Rpb9 võib osaleda transkriptsiooni elongatsioonis ja selle täpsuse kontrollimises. Esiteks pakuti välja, et Rpb9 võib osaleda õige nukleotiidi lülitamisel sünteesitavasse mRNA-sse, aga see tähendaks ulatuslikke konformatsioonilisi muutusi. Teiseks, arvestades Rpb9 positsiooni polümeraasil, on võimalikud interaktsioonid näiteks kromatiini remodeleerivate kompleksitega, histoonide modifitseerijatega või Elongaator kompleksiga (Van Mullem et al., 2002). Kolmandaks võimaluseks on see, et Rpb9 on vajalik RNA pol II eksonukleasiks aktiivsuseks ja seega valesti

sünteesitud nukleotiidide välja lõikamiseks. Ühes hiljem avaldatud artiklis on aga näidatud, et Nesser-i ja tema kolleegide välja pakutud mehhanism, kus Rpb9 osaleb nukleotiidide lülitamises mRNA ahelasse võib olla võimalik just konformatsiooniliste muutuste tõttu. Rpb9 C-terminaalne Zn2 domeen paikneb suhtelises läheduses “trigger loop”-i nimelisele struktuursele üksusele, mis läbib konformatsioonilisi muutusi iga nukleotiidi lülitamisel ahelasse (Walmacq et al. 2009). Samuti näidati, et Rpb9 on vajalik TFIIS-i poolt stimuleeritud valede nukleotiidide välja lõikamiseks mRNA ahelast. See seletab ka, miks *rpb9Δ* rakkudes esineb rohkem valesid nukleotiide sisaldavaid transkripte (Knippa ja Peterson 2013).

1.6.3 Rpb9 poolt vahendatud DNA reparatsioon

Imetajarakkudes vastutavad transkriptsiooniseoselise DNA reparatsiooni eest kaks valku – CSA ja CSB (ingl. k. *Cockayne syndrome group A and B*). *S. cerevisiae*-s on samuti kaks transkriptsiooniseoselist DNA reparatsiooni rada, millest üks on vahendatud Rad26 ja teine Rpb9 poolt. Rad26 on inimese CSB valgu homoloog ning vastutab reparatsiooni eest, mis toimub nii promootoralas kui ka geeni kodeerivas osas. Rpb9-vahendatud reparatsioon on aga koondunud pigem geeni kodeerivale alale. Mõlemad reparatsioonimehhanismid on kasutatavad transkribeeritava ahela vigade detekteerimiseks ja parandamiseks ning on näidatud, et reparatsioonimuster võib varieeruda erinevatel promootoritel vastavalt sellele, milliseid elemente (TATA, UAS – *upstream activating sequence*) need sisaldavad (Li ja Smerdon 2002, 2004; Li et al. 2006). On välja pakutud, et Rpb9 osaleb DNA parandamises läbi oma funktsiooni transkriptsiooni elongatsioon. Need järeldused on tehtud katsetest, milles *rpb9Δrad26Δ* rakkudele lisatud *spt4* geeni deletsioon, mis soodustab RNA pol II elongatsiooni, taastab rakkude võimet UV-kahjustustest üle saada (Li et al. 2006b). Samuti on näidatud, et Rpb9 on vajalik RNA pol II suurima subühiku, Rpb1, degradeerimiseks vastusena UV-kahjustustele ning on välja pakutud, et selles osaleb Rpb9 Zn2 domeen (Chen, Ruggiero ja Li, 2007).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida histoonide H3 ja H4 modifikatsioonide mõju RNA polümeraas II subühiku Rpb9 deletsiooniga *S. cerevisiae* rakkude kasvukiirusele.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud söötmed

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

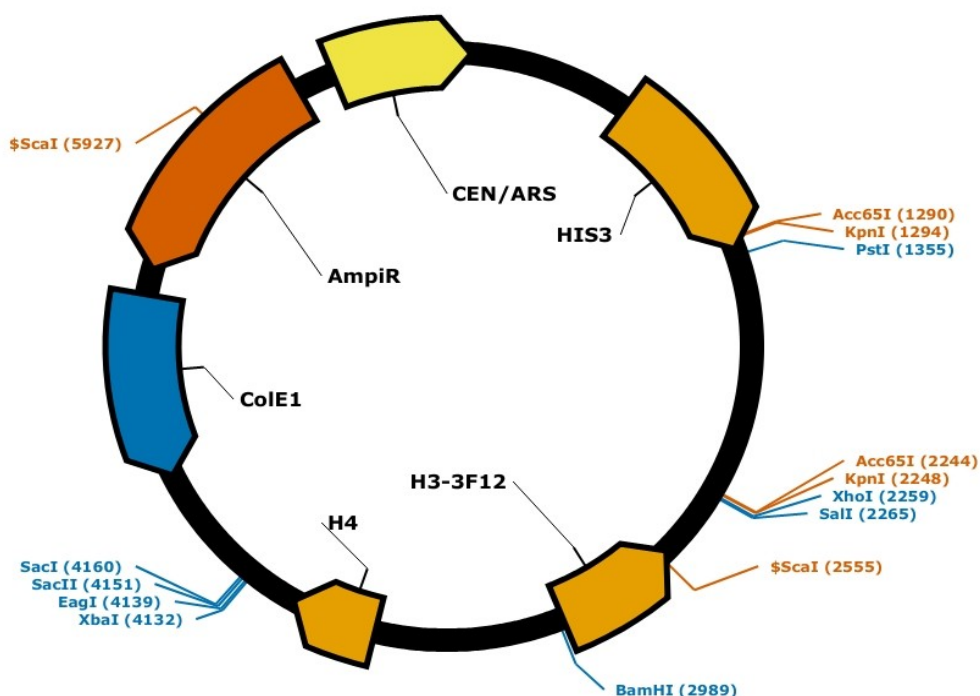
Rpb9 geeni deletsiooni kontrolliti NAT (*nourseothricin*) resistentsusega antibiootikumi sisaldaval YPD tardsöötmele (*nourseothricin* 100 µg/ml). Modifitseeritud tüvede konstrueerimisel kasvatati pärmi transformeerunud rakkude selekteerimiseks – HIS – LEU – TRP – LYS agarsöötmele [agar 20 g/l (*LAB MTM*), YNB (*Yeast nitrogen base, Applichem*) 6,7 g/l, glükoos 20 g/l (*Medipharmia*), adeniin 20 µg/ml (*Sigma[®]*) ja uratsiil 20 µg/ml (*SERVA*)]. *URA3* seleksioonimarkeriga plasmidi puudumist rakkudes kontrolliti 5-FOA-d (*5-fluoroorotci acid*) sisaldaval selektiivsöötmele [5-FOA 1 mg/ml (*Toronto Research Chemicals Inc.*), YNB 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 2%, lämmastikalused ja aminohapped – adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml].

2.2.2 Kasutatud tüved ja plasmiidid

Käesolevas töös kasutati pärmitüve W303 modifikatsioonist AKY217 valmistatud deletsioonitüve AKY696 (*ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100R hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 YCp50:hht2-hhf2 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6*), mille *rpb9* deletsioon oli tehtud kasutades NAT-i (*nourseothricin*) resistentsuse kasseti sisaldavat plasmidi. Katsete jaoks oli oluline mõlema histoonivalkude koopia deletsioon genoomist ja nende ekspressioon *URA3* markergeeni sisaldava plasmidi pealt.

Katsetes kasutatud plasmiidid olid valmistatud *HIS3* markergeeniga pRS413 seeria plasmidi põhjal (Joonis 5), kuhu olid kloneeritud muteeritud *S. cerevisiae* histoonid. Mutatsioonid on viidud H3 ja H4 modifitseeritavatesse positsioonidesse ja kontrolliks kasutati metsiktüüpi histoone kodeerivat plasmidi (Lisa 1).

Muteeritud histoone kodeerivad plasmiidid transformeeriti *rpb9* deletsioonitüvesse ja Rpb9-t sisaldavasse kontrolltüvesse. Kokku saadi 42 uut pärmitüve, millega teostati töös kirjeldatud katseid (Lisa 2).



Joonis 5. Töös kasutatud plasmiidide pRS413 seeria *HIS3* markergeeniga baasplasmidi kaart. Kaardil on välja toodud histoonid H4 ja epitoobiga märgitud H3-3F12, *HIS3* markergeen, ampitsilliini resistentsusgeen (*Amp^r*), *E. coli* replikatsiooni alguspunkt, pärimi tsentromeerne järjestus (CEN/ARS) ning mõned restriksioonikohad.

2.2.3 Deletsioonitüve valmistamine

RPB9 geeni deleteerimiseks kasutati NAT-i resistentsuse kassetti sisaldavat plasmidi P-3myc-NAT-MX6, millelt *NAT*-i geeni amplifitseeriti *RPB9* külgnevaid järjestusi sisaldavate praimeritega (RPB9-KO-5': 5' AGAGCAAGTTAAACTCCCCTTAAACTGCTATGAC TACGTTTAGATTTGGATAGCTCATTTGGAGTT 3', RPB9-KO-3': 5' CCCATTT TCTCTCCCTCTGTCATTAATTTGAAAGTTCGTTGAGCACTCACAGCAAACAGCTATGA CCA 3').

PCRi reaktsioon viidi läbi 50 µl-s. Reaktsioonisegu sisaldas 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 µM praimereid RPB9-KO-3' ja RPB9-KO-5', 1x Pfu puhvrit (*Fermentas*, Leedu), 2,5 U Pfu DNA polümeraasi (*Fermentas*, Leedu), 1,2 ng/µl plasmidi ning lõppmahuni vett. Kontrolliks kasutati reaktsioonisegu, mis ei sisaldanud plasmidi. Markergeeni amplifitseerimiseks kasutati järgmist programmi:

Algne denaturatsioon: 95 °C 15 min	} 30 tsüklit
Denaturatsioon: 94 °C 30 sek	
Praimerite seondumine: 60 °C 30 sek	
Praimerite ekstensioon: 72 °C 3 min	
Lõpp-ekstensioon: 72 °C 7 min	

Amplifitseeritud fragmendi olemasolu ja pikkust kontrolliti geelelektroforeesiga. Saadud PCRi produkti sadestati ja lahustati 25 µl-s vees.

2.2.3.1 Pärmis elektroporatsioon

RPB9 deleteerimiseks genoomsest DNA-st elektroporeeriti rakkudesse *RPB9* geeni külgnevaid järjestusi sisaldavat NAT-i markergeeni, mis eeldatavalt põhjustab märklaudgeeni deletsiooni kasutades raku enda rekombinatsioonimehhanisme ja viib resistentsusgeeni *RPB9* asemele genoomsesse DNA-sse. Elektroporatsioon oli läbi viidud järgnevalt.

Tüve AKY217 kasvatati YPD vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30 °C kuni tiheduseni 1 x 10⁸ rakku/ml. Rakukultuuri tihedust mõõdeti rakuloenduriga (*ZTM COULTER COUNTER[®] Cell and Particle Counter, Beckman Coulter*). Rakukultuuri tsentrifugiti 5 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), supernatant eemaldati, rakud suspendeeriti 9 ml-s TE-s, lisati 1 ml 1 M liitiumatsetaati ning jäeti loksuma veel 45 minutiks kiirusega 100 rpm (*New Brunswick Scientific ExcellaTM E25*). 45 minuti möödudes lisati 250 µl 1 M DTT (ditiotreitool) ja jäeti loksuma veel 15 minutiks. Edasi lisati rakkudele 40 ml vett ja tsentrifugiti 5 minutit. Seejärel pesti ja

tseentrifuugiti rakke 2 korda 50 ml jääkülma veega. Alates sellest hetkest hoiti rakke jääl. Rakud suspendeeriti 1 ml jääkülmas 1 M sorbitoolis, tõsteti 1,5 ml reaktsioonituubi ja tseentrifuugiti 1 minut 3300 g-ga. Supernatant eemaldati ja korrati viimast etappi. Seejärel lisati rakkudele 50 µl 1 M sorbitooli, suspendeeriti ja tõsteti saadud tihedast rakusegust 40 µl uude reaktsioonituubi. Rakkudele lisati 15 µl puhastatud PCRi produkti ning tõsteti saadud segu 2 mm elektroporatsiooni küvettidesse. Elektroporeerimine viidi läbi poraatoriga (*Bio-Rad Gene Pulser Xcell*) ja kasutati pärmile mõeldud eelseadistatud programmi. Pärast poreerimist jäeti rakud 20 minutiks jääle, seejärel tõsteti need 1,5 ml reaktsioonituubi ja tseentrifuugiti 1 minut 3300 g-ga. Seejärel supernatant eemaldati, rakusade suspendeeriti 100 µl vees ning külvati välja YPD tardsöötmele. Järgmisel päeval tembeldati tihedaks kasvanud rakud antibiootikumi NAT sisaldavale selektiivsöötmele ja inkubeeriti 3 päeva temperatuuril 30°C.

2.2.3.2 Transformeeritud kolooniade kontrollimine

Antibiootikumit sisaldaval tassil üles kasvanud transformeeritud kolooniatest eraldati DNA-d ja kontrolliti PCRi reaktsiooniga.

DNA eraldamine oli teostatud järgmisel viisil:

Võeti üks koloonia ja suspendeeriti see 100 µl-s 200 mM liitiumatsetaat + 1% SDS lahuses. Saadud suspensiooni inkubeeriti 5 minutit 70 °C juures, seejärel lisati 300 µl 96% etanooli ja väristati vorteksil. Segu tseentrifuugiti 3 minutit 15000 g-ga, supernatant eemaldati ja sadet pesti 70% etanooliga. Edasi võeti sade üles 100 µl vees ja tseentrifuugiti 15 sekundit 15000 g-ga. Saadud genoomset DNA-d kontrolliti PCR-ga kasutades selleks 1 µl supernatanti (Lõoke, Kristjuhan ja Kristjuhan, 2011).

Transformeeritud kolooniade kontrollimiseks kasutati praimereid, millest üks seondub genoomsele DNA-le deleteeritud geeni promotoralas ja teine plasmiidilt amplifitseeritud resistentsusgeeni järjestusele (RPB9-ctrl: 5' TCAATACGGTTTTTCAGCTCGT 3'; FBA1-ctrl 5' CGAACTCCAAAATGAGCTATC 3'). Sellisel viisil tehti kindlaks, et markergeen on sisenenud

õigesse piirkonda. PCRi reaktsioon viidi läbi 10 µl-s. Reaktsioonisegu sisaldas 1 x FIREPol® *Master Mix (Solis Biodyne)*, 1 µM F+R praimereid, 1 µl DNA-d (eraldatud DNA, kirjeldatud eespool) ja lõppmahuni vett. PCRi programm oli järgmine:

Algne denaturatsioon: 95 °C 5 min	} 28 tsüklit
Denaturatsioon: 94 °C 30 sek	
Praimerite seondumine: 58 °C 30 sek	
Praimerite ekstensioon: 72 °C 1 min	
Lõpp-ekstensioon: 72 °C 7 min	

Õigeteks osutunud kolooniatest valiti üks ja kasutati seda järgnevates katsetes.

2.2.4 Mutantsete histoonide kombineerimine *RPB9* deletsiooniga

Valmistatud *rpb9Δ* deletsioonitüve geneetiline taust võimaldas kasutada plasmiidide vahetamise meetodit (*plasmid shuffling*). Meetodi põhiolemus seisneb selles, et enne transformeerimist sisaldavad rakud *URA3* geeni ning on võimelised uratsiili iseseisvalt sünteesima. Pärast uue plasmidi transformeerimist (marker geen pole oluline) rakkudesse on võimalik vana, *URA3*-e sisaldavat plasmidi rakkudest eemaldada, kasvatades neid 5-FOA-d sisaldaval selektiivtassil. 5-FOA konverteeritakse *URA3* geeni sisaldavates rakkudes toksiliseks komponendiks ning rakud on sunnitud *URA3* marker geeniga plasmidi eemaldama.

Valmistatud *rpb9Δ* tüves olid metsiktüüpi histoonid kodeeritud *URA3*-e sisaldavalt plasmiidilt, mis võimaldas kasutada eelpool kirjeldatud meetodit metsiktüüpi histoonide asendamiseks muteeritud histoonidega. Mutantsed histoonid olid kodeeritud plasmiidilt, mis sisaldas *HIS3* marker geeni ning histoonile H3 oli lisatud 3F12-epitooop, mida on võimalik detekteerida *Western blot* meetodiga.

2.2.4.1 Pärmirakkude transformatsioon plasmiidiga ja kolooniate kontrollimine

Rakke kasvatati üleöö 20 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C tiheduseni 5×10^7 rakku/ml. Rakukultuuri tsentrifugeeriti 3 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), supernatant eemaldati, lisati 10 ml 0,1 M liitiumatsetaat + TE lahust ning tsentrifugeeriti veel 3 minutit sama kiirusega. Seejärel suspendeeriti rakke 600 µl 0,1 M liitiumatsetaat + TE lahuses ning lisati 100 µl *carrier DNA*-d (2 mg/ml), mis oli eelnevalt denatureeritud 7 minutit temperatuuril 95 °C. Edasi segati kokku transformatsioonisegu: 2 µl (1 µg/µl) plasmidi ja 50 µl valmistatud kompetentseid rakke. Transformatsioonisegu hoiti 5 minutit toatemperatuuril ja seejärel lisati 300 µl LiOAc + TE + PEG lahust (0,1 M liitiumatsetaat + TE, 40% PEG (Mw = 40 000)). Segu väristati vorteksil ning hoiti toatemperatuuril 15 minutit. Edasi lisati 30 µl 100% DMSO-d (dimetüülsulfoksiid), segati vorteksil ja inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 42 °C. Seejärel tsentrifugeeriti rakke 1600 g-ga, supernatant eemaldati, rakusade suspendeeriti 150 µl-s vees ja külvati – HIS – LEU – TRP – LYS selektiivtassidele.

Transformatsioonist saadud kolooniad külvati ümber 5-FOA tassidele, et eemaldada rakkudest vana, *URA3*-e ja metsiktüüpi histoone kodeerivat plasmidi. Sellega tagati, et rakkudesse jääksid ainult soovitud, mutantsete ja 3F12-epitoobiga märgistatud histoonidega plasmiidid või kontrollplasmiid, mis kodeerib metsiktüüpi histoone ning sisaldab samuti 3F12-epitoopt ja sobib hästi kontrolliks.

2.2.5 3F12-epitoobiga märgistatud histoonide detekteerimine *Western blot* meetodiga

Rakkudesse transformeeritud plasmiidilt kodeeritud histoon H3 oli märgistatud 3F12 – epitoopjärjestusega, mis võimaldas transformeeritud histoonide olemasolu kinnitamist *Western blot* meetodiga. Rakke kasvatati üleöö 2 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C. Rakukultuuri tihedust mõõdeti rakuloenduriga (*ZTM COULTER COUNTER[®] Cell and Particle Counter, Beckman Coulter*) ning rakulüsaadi valmistamiseks võeti võrdne arv rakke (2,5 või 5×10^7 rakku/ml). Vastav kogus rakukultuuri tsentrifugeeriti lauafuugiga 15 sekundit 13 000 rpm

(Sigma 4K 15C, rootor 272/F). Seejärel supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 100 µl-s vees, lisati 100 µl 0,2 M NaOH-d ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Rakulüsaati tsentrifuugiti jälle 15 sekundit, supernatant eemaldati ning rakusade võeti üles 50 µl-s 2x SDS laadimispuhvril (2% SDS, 0,06 M Tris-ClpH 6,8, 5% 2-merkaptotoetanool, 10% glütserool, 0,002% broomfenoolsinine) ning kuumutati 3 minutit temperatuuril 95 °C. Seejärel tsentrifuugiti proove 15 sekundit ning geelile kanti sõltuvalt algsest rakkude kontsentratsioonist 5 µl või 10 µl valmistatud valguproovist.

Valmistatud lüsaadis sisalduvad valgud lahutati SDS-polüakrüülamiidgeelis, millest 1/3 moodustas kontsentreeriv 5% geel [5% polüakrüülamiid, 0,1% SDS, 125 mM Tris-Cl pH 6,8, 0,1% naatriumpersulfaat, 0,06% TEMED (tetrametüületüendiamiin)] ning 2/3 lahutav 12% geel (12% polüakrüülamiid, 0,1% SDS, 375 mM Tris-Cl pH 8,8, 0,04% naatriumpersulfaat, 0,04 % TEMED). Geeli voolutati ühekordses SDS puhvril (0,125 M Tris, 0,96 M glütsiin, 0,5 % SDS). Valkude ülekannet membraanile teostati poolkuiva ülekande masinas (BIO-RAD *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*). Kõigepealt asetati masinale ülekandepuhvril (0,48 M Tris, 0,39 M glütsiin, 0,037 % SDS, 20 % metanool) immutatud 3 Watmani paberilõiku, seejärel eelnevalt metanooliga (BioTop) niisutatud PVDF membraani (Millipore Immobilon), membraani peale asetati polüakrüülamiidgeel ning kaeti see ülekandepuhvril immutatud 3 Watmani paberilõiguga. Ülekannet tehti 40 minutit 15 V-ga. Seejärel inkubeeriti membraani 30 minutit toatemperatuuril 5 %-lises lõssipulbri lahuses (5 % lõssipulbrit, PBS-Tween20 0,05 %) vältimaks antikehade mittespetsiifilist seondumist membraanile järgnevatel etappidel. Edasi inkubeeriti membraani 45 minutit 5 ml-s 5 %-lises lõssipulbri lahuses hiire saadud 3F12 vastase antikehaga 5E11 (*Quattromed*, algkontsentratsioon 1 mg/ml, lahjendus 1:10000). 45 minuti möödudes pesti membraani 5 korda 3 minutit PBS-Tween20 0,05 % lahusega. Sekundaarse antikehaga, milleks oli HRP-ga konjugeeritud hiire IgG vastane antikeha (algkontsentratsioon 0,8 mg/ml, lahjendus 1:160000) inkubeeriti samuti 45 minutit 5 %-lises lõssipulbri lahuses. Seejärel pesti membraani uuesti 5 korda 3 minutit PBS-Tween20 0,05 % lahusega ning signaal detekteeriti ECL detekteerimislahustega (*Amersham Pharmacia Biotech*, ECL™) vastavalt tootja juhendile. Signaali salvestati kasutades masinat BioSpectrum® Imaging System™ (*Ultra-Violet Products Ltd.*)

2.2.6 Kasvukiiruse mõõtmine

Histoonide H3 ja H4 mutatsioonide mõju uurimiseks *rpb9Δ* rakkude kasvule, teostati katsed, milles mõõdeti nii *rpb9* deletsiooniga kui ka normaalse RNA pol II-ga histoonimutantide kasvukiirust võrdsetes tingimustes. Kõik tüved kasvatati üleöö loksutil 3 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C ligikaudse tiheduseni 1×10^7 rakku/ml. Rakukultuuride tihedust mõõdeti rakuloenduriga ning lahjendati sama tiheduseni (5×10^6 või 6×10^6 rakku/ml) 2 ml YPD vedelsöötme sisse. Järgnevalt võeti ajapunkte iga kahe tunni möödudes kaheksa tunni vältel. Iga ajapunkti ajal võeti rakukultuuri tiheduse mõõtmiseks 100 µl proovi. Katses uuritud mutantide generatsiooniaja arvutamiseks kasutati 2h ja 8h ajapunktide andmeid. Generatsiooniaeg arvutati järgmiste valemite järgi:

$$\text{Generatsiooniaeg} = t/g ,$$

$$g = [\log_{10}(N_t/N_0)] / 0.3 ,$$

kus t – aeg, g – generatsioonide arv, N_0 – rakukultuuri tihedus ajapunktil 0, N_t – rakukultuuri tihedus ajapunktil t .

2.3 Tulemused

Käesolevas töös uuriti histoonide H3 ja H4 mutatsioonide mõju *rpb9* deletsiooniga *S. cerevisiae* rakkude kasvukiirusele. Varasemate tulemuste põhjal on teada, et *rpb9* deletsiooniga pärmirakud on aeglasema kasvuga. Rpb9, olles RNA pol II subühik, on oluline transkriptsiooni initsiatsioon, elongatsioon ja ka transkriptsiooniseoselises DNA reparatsioon ning võib arvata, et *rpb9Δ* rakud on aeglasema kasvukiirusega mainitud protsessides põhjustatud defektide tõttu. Kuna on teada, et transkriptsiooni regulatsioon toimub suures osas DNA-ga seotud histoonide modifikatsioonide kaudu, on alust arvata, et histoonide modifitseeritavate positsioonide muteerimisel võib olla kas soodustav või pärssiv mõju *rpb9Δ* rakkude kasvule.

2.3.1 *RPB9* deletsioon genoomist

Töös läbi viidud katsete jaoks oli oluline *RPB9* geeni deletsioon sobiva geneetilise taustaga pärmitüves. Selleks oli valitud meie laboris valmistatud tüvi AKY217, mille genoomist deleteeriti *RPB9* geen, asendades seda NAT-i resistentsust andva geeniga. *NAT* geeni integreerumist soovitud lookusesse kontrolliti PCR reaktsiooniga kasutades praimereid, millest üks seondub genoomsele järjestusele ning teine rakku integreeritud DNA-le. Tulemusena saadi *rpb9* deletsiooniga pärmitüvi, millesse oli võimalik transformeerida muteeritud histoone kodeerivaid plasmide (Joonis 6). Edasisteks katseteks kasutati kolooniat number 9.



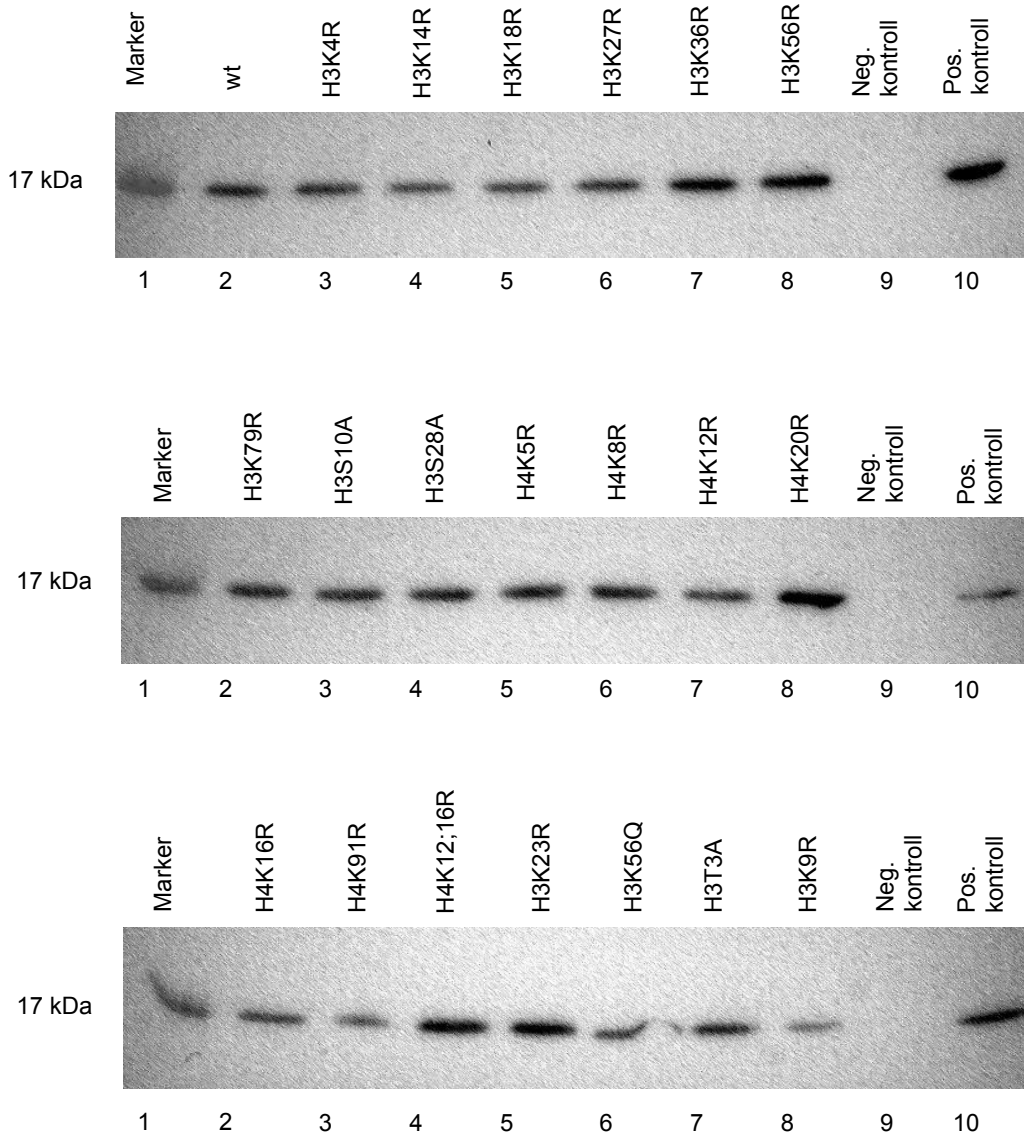
Joonis 6. *RPB9* geeni deletsiooni kontrollimine PCR-ga. Elektroporatsioonist saadud kolooniate (1-10) kontrollimine.

2.3.2 Mutantsete histoonide transformatsioon *S. cerevisiae* rakkudesse

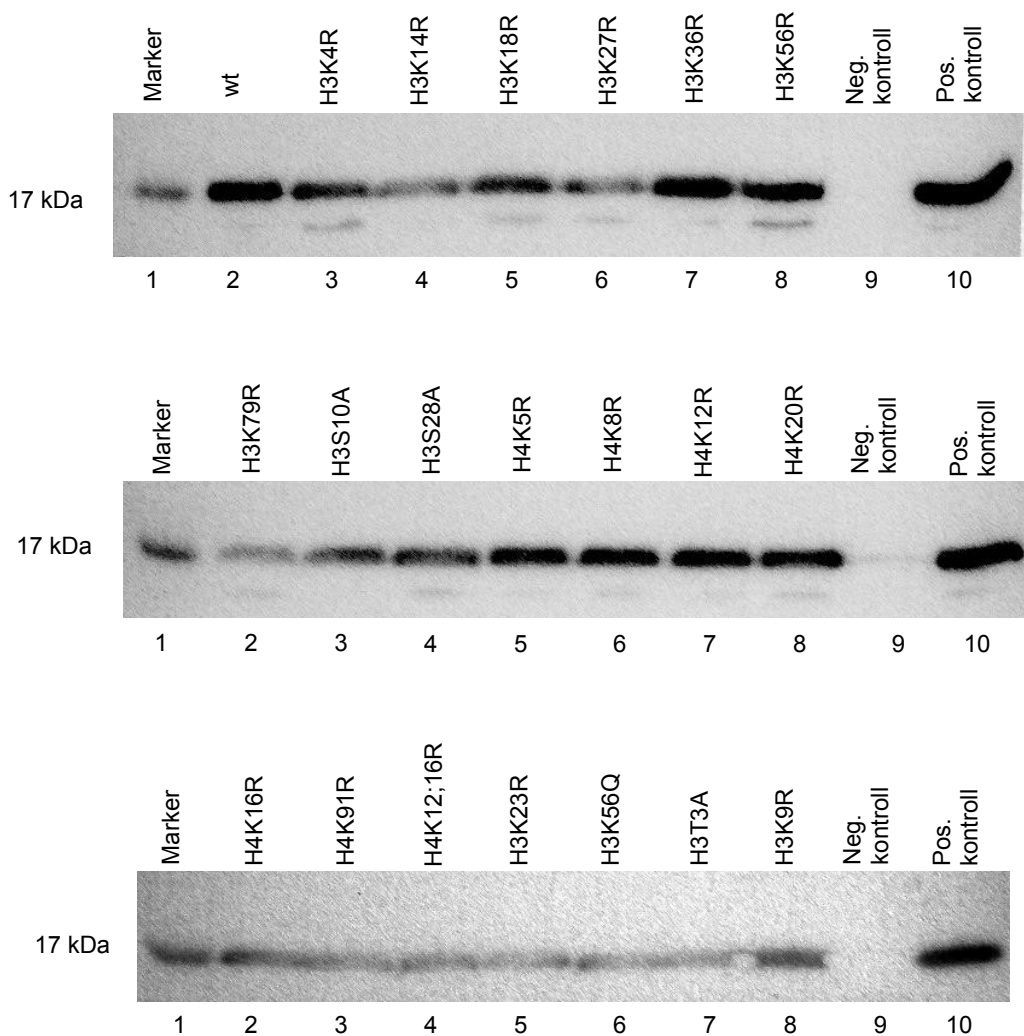
Muteeritud histoonide kombineerimiseks *rpb9* deletsiooniga transformeeriti *rpb9Δ* ja metsiktüüpi RNA pol II sisaldavaid rakke muteeritud histoonide H3 ja H4 kodeerivate *HIS3* markergeeni kodeerivate pRS413 seeria plasmiididega (Lisa 1). Transformeerunud rakke selekteeriti – HIS – LEU – TRP – LYS selektiivsöötmele, et tagada soovitud plasmidi olemasolu. Rakkudes eelnevalt sisaldunud metsiktüüpi histoonide kodeerivad *URA3* markergeeniga plasmiidid eemaldati kasutades 5-FOA-d. Tulemusena saadi 21 *rpb9Δ* taustaga ja 21 metsiktüüpi polümeraasiga pärmitüve, mida kasutati histoonimodifikatsioonide mõju uurimiseks *rpb9Δ* rakkudele (Lisa 2).

2.3.3 3F12-epitoobiga histooni H3 detekteerimine *Western blot* meetodiga

Muteeritud histoonide ekspressiooni kindlaks tegemiseks teostati *Western blot* analüüs, millega näidati, et kõik valmistatud tüved sisaldavad transformeeritud pRS413 seeria plasmiidilt kodeeritud 3F12-epitoobiga märgistatud histooni H3 (Joonised 7 ja 8). Sellega saadi veel kord kinnitust, et valmistatud pärmitüved on õiged ja sobivad soovitud katsete läbiviimiseks.



Joonis 7. 3F12 epitoobiga histooni H3 ekspressioon plasmiidilt metsiktüüpi RNA pol II-ga pärmirakkudes. Radadel 1 on marker, radadel 2 – 8 on mutantseid histoone kodeerivate plasmiididega rakkudest valmistatud lüsaatide proovid. Radadel 9 on negatiivne kontroll ehk algsest pärmitüvest (AKY217) valmistatud lüsaat, mis ei sisalda 3F12-epitoobiga märgitud histooni H3. Radadel 10 on positiivne kontroll ehk genoomses lookuses 3F12 epitoobiga märgistatud histooni H3 sisaldavatest rakkudest valmistatud valgu proov.



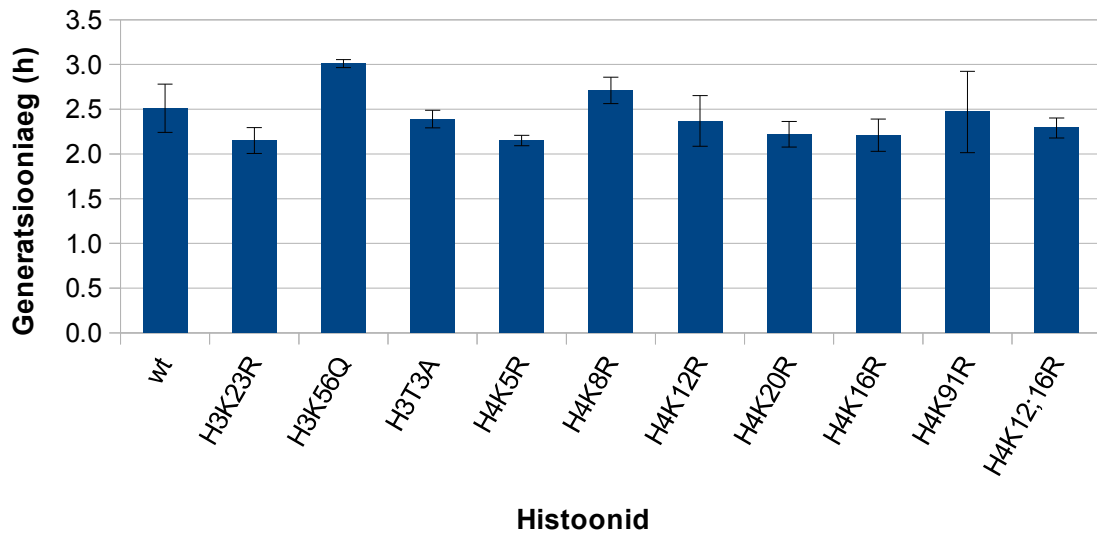
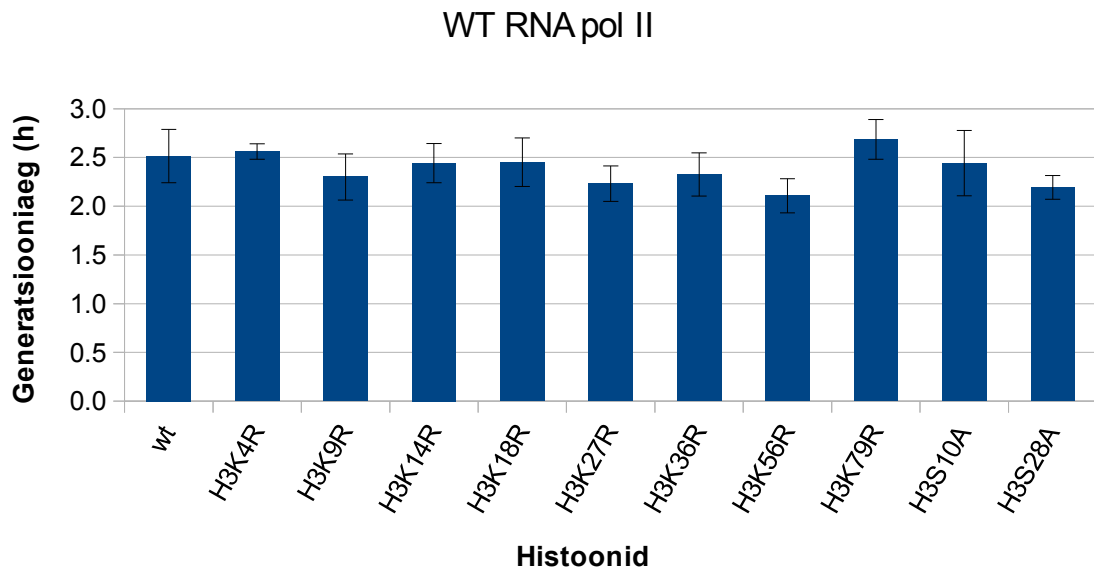
Joonis 8. 3F12 epitoobiga histooni H3 ekspressioon plasmiidilt *rpb9* deletsiooniga pärmirakkudes. Radadel 1 on marker, radadel 2 – 8 on mutantseid histoone kodeerivate plasmiididega rakkudest valmistatud lüsaatide proovid. Negatiivseks ja positiivseks kontrolliks kasutati samu rakulüsaate nagu joonisel 7 esitatud katses.

2.3.4 Histonimutatsioonide mõju kasvukiirusele

Histonimutatsioonide mõju uurimiseks *rpb9* deletsiooniga mutantides teostati katsed paralleelselt nii *rpb9Δ* rakkudega kui ka terviklikku RNA pol II sisaldavate rakkudega. Uuriti histooni H3 ja H4 modifitseeritavate positsioonide 20 mutatsiooni mõju rakkude kasvule, mõõtes mutantide kasvukiiruseid võrdsetes tingimustes. Tulemuste paremaks visualiseerimiseks ja interpreteerimise hõlbustamiseks arvatati kasvukiiruse mõõtmise tulemuste põhjal mutantide generatsiooniajad.

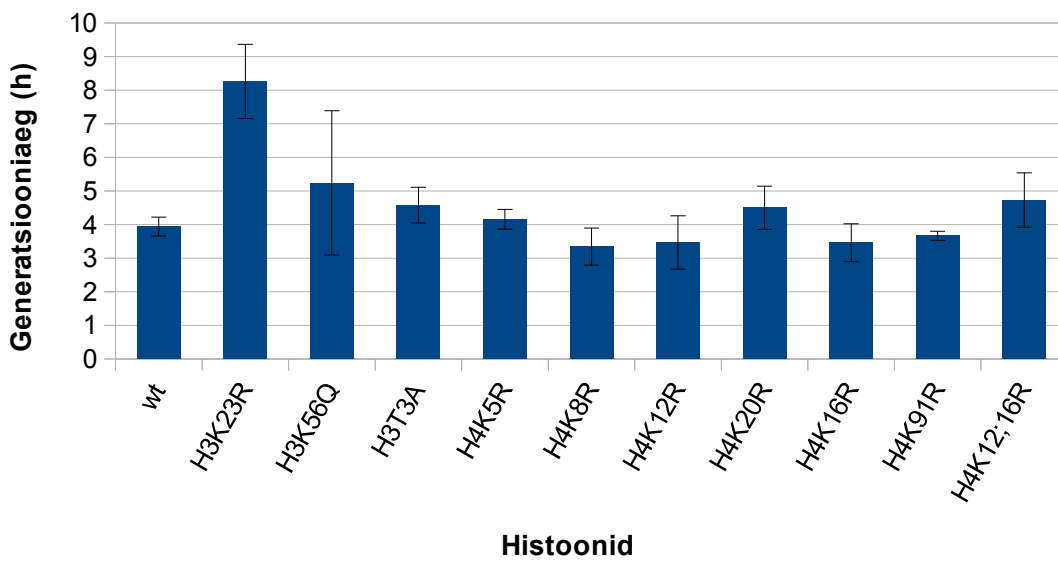
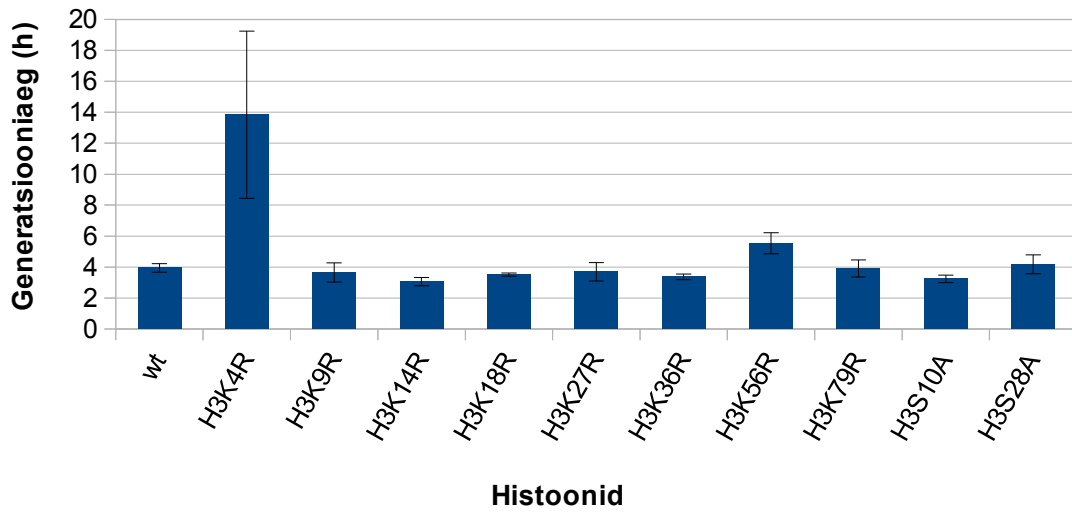
Metsiktüüpi RNA pol II sisaldavates rakkudes ei täheldatud ühegi histoonimutatsiooni marginaalset mõju rakkude kasvukiirusele (Joonis 9). Saadud tulemus on ootuspärane, sest vaatamata histoonimodifikatsioonide tähtsusele kromatiini pakkeseisundis ja DNA kättesaadavuses kromatiinil töötavatele faktoritele, on loomulik eeldada, et üksikud histoonimutatsioonid ei oma suurt mõju üldisele kromatiini olekule ning kõik elulise tähtsusega protsessid saavad toimuda vajalikul tasemel.

Rpb9 deletsiooniga histoonimutantide kasvukiiruse katse näitas mitme histoonimodifikatsiooni olulisust *rpb9Δ* rakkude võimes kasvada ja punguda (Joonis 10). Esiteks, kinnitavad saadud tulemused seda, et *rpb9Δ* rakud on metsiktüüpi pärmirakkudest aeglasema kasvuga, sest nagu joonisel 10 näha, on ka metsiktüüpi histoonidega *rpb9Δ* tüvi ligi kaks korda aeglasem normaalse RNA pol II-ga rakkudest (võrdle joonisega 9). *Rpb9* deletsiooniga rakkudele olulisteks modifitseeritavateks positsioonideks osutusid histoon H3-me lüsiinid K4 ja K23. H3K4 trimetülatsioon on levinud promootorala ja geeni alguspiirkonna modifikatsioon ning selle mutatsiooni tugev mõju *rpb9Δ* rakkudele jätab palju ruumi spekulatsioonideks. H3K23 on atsetüleeritav positsioon ning arvatavasti käitub see signaalmodifikatsioonina teisi aminohappejääke modifitseerivatele ensüümidele.



Joonis 9. Metsiktüüpi RNA pol II histoonimutantide kasvukiirus. Y-teljel on välja toodud uuritud tüvede generatsiooniaeg tundides. X-teljel esitatud tulpade all on näidatud tüvede histoonimutatsioonid. Veapiiridena on välja toodud 4 katse standardviga.

RNA pol II Δ Rpb9



Joonis 10. RNA pol II Δ Rpb9 histoonimutantide kasvukiirus. Y-teljel on välja toodud uuritud tüvede generatsiooniaeg tundides. X-teljel esitatud tulpade all on näidatud tüvede histoonimutatsioonid. Veapiiridena on välja toodud 4 katse standardviga.

2.4 Arutelu

Transkriptsiooni kui elulise tähtsusega molekulaarse protsessi üheks suurimaks väljakutseks on kromatiin, mis seob ja kaitseb DNA-d osaledes selle kaudu otseselt geeniekspressiooni regulatsioonis. DNA-ga seotud histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid mõjutavad nii kromatiini pakkeseisundi muutumist kui ka teiste valkude kromatiinile seondumist ja spetsiifiliste piirkondade ära tundmist (Kouzarides, 2007). Käesolevas töös uuritud histoonide modifitseeritavad positsioonid on kõik seotud transkriptsiooni ja selle regulatsiooniga, mille tõttu RNA pol II subühik 9 (Rpb9) deletsiooniga rakud on heaks taustsüsteemiks nende uurimiseks. *rpb9* deletsioon põhjustab mitmeid transkriptsiooniga seotud defekte ja omab aeglase kasvu fenotüüpi.

Antud töös saadud tulemused näitasid, et vaatamata uuritud histoonimodifikatsioonide iseloomustatud tähtsusele transkriptsiooniseoselistes protsessides, ei põhjusta nende üksikud muteerimised metsiktüüpi histoonidega rakkudest erineva fenotüübi (Joonis 9). Teadaolevalt on histoonimodifikatsioonid väga dünaamilised ja erinevate modifikatsioonide vahel esineb tihti vastastikune regulatsioon (Latham ja Dent 2007). Saadud tulemused kinnitavad seda, et transkriptsiooni regulatsioonis osalevad kompleksid „loevad” üldist kromatiini seisundit ning oluline on teiste modifikatsioonide kontekst, mistõttu üksikul histoonimodifikatsioonil ei ole väga suurt mõju üldisele kromatiini olekule. See kinnitab ka 2000. aastal välja pakutud histooni koodi teooriat (*histone code*), mille kohaselt avaldub histoonide modifikatsioonide mõju olles omavahel kombineeritud, moodustades nõ. mustri (Strahl ja Allis 2000).

Rpb9 deletsiooniga histoonimutantide katsed näitasid, et histooni H3 lüsiini K4 muteerimisel pikeneb rakkude generatsiooniaeg pea neljakordselt. H3K4 metüleeritakse ühe-, kahe- või kolmekordselt (mono-, di- või trimetüleerimine) ning selle trimetülatsioon H3K4me3 on levinud promootrala märgiseks. Metüleerimise tase väheneb geeni 3' otsa suunas (C. L. Liu et al., 2005; Pokholok et al., 2005). Kuna RNA pol II subühikul Rpb9 on iseloomustatud tähtsust transkriptsiooni initsiatsioonis, on võimalik, et *rpb9Δ* rakkudes põhjustab H3K4 mutatsioon niivõrd ulatuslikke transkriptsiooni initsiatsiooni raskusi, et kõik raku protsessid on selle tõttu

aeglustunud. Saadud tulemus võib viidata ka Rpb9 suuremale tähtsusele transkriptsiooni initsiatsioonil, kui varem arvatud, sest vaatamata Rpb9 rollile transkriptsiooni elongatsioonil, ei avalda näiteks geeni kehal levinud H3K36 metüleerimise takistamine *rpb9Δ* rakkudele mingit efekti. Joonisel 10 on näha, et H3K4R mutandil on teiste uuritud mutantidega võrreldes suuremad veapiirid, mis on põhjustatud katsetulemuste kõikumisest. Kasvukiiruse katse läbi viimisel täheldati, et *rpb9Δ* H3K4R mutandi kasvukiirus muutus sõltuvalt rakkude vanusest (alates -80 °C juures säilitatud *stock*-st välja külvamisest) ning vanemate rakkudega teostatud katsed andsid tulemuseks pikema generatsiooniaja. Antud tähelepaneku põhjal võib eeldada, et H3K4 muteerimine põhjustab *rpb9Δ* rakkude kiirema vananemise. *Rpb9Δ* H3K4R mutandi edasine uurimine võiks kaasa aidata nii Rpb9 funktsiooni detailsemale kirjeldamisele, mis on oluline eukarüootse transkriptsiooni mõistmisele kui ka rakkude vananemise protsessi kirjeldamisele.

Histooni H3 modifitseeritava positsiooni K23 muteerimise efekt *rpb9Δ* rakkude generatsioonijale on samuti intrigeeriv, sest erinevalt inimese rakkudes toimuvast H3K23 atsetüleerimisest ei ole pärmil selle positsiooni modifitseerimisel kirjeldatud ühtegi spetsiifilist ülesannet. Inimeses on H3K23 atsetüleerimine vajalik TRIM24 nimelise transkriptsiooni koaktivaatori kohaletoomiseks, mis osaleb kindlate geenide aktivatsioonis (Tsai et al., 2010). Pärmis atsetüleerib H3 positsiooni K23 atsetültransferaas NuA3 ka histooni H3 positsiooni K14 ning on näidatud, et NuA3 võib kromatiiniga interakteerumiseks vajada H3K4 ja/või H3K36 metüleerimist (Kouzarides et al., 2006). H3K4 trimetüleerimise olemasolu tähtsust H3K14 atsetüleerimiseks NuA3 poolt kinnitavad ka Smart-i ja kolleegide tulemused (Smart et al., 2009). Mainitud avaldatud andmeid arvesse võttes, võiks välja pakkuda, et töös saadud *rpb9Δ* H3K23R mutandi tulemus viitab taaskord transkriptsiooni aktivatsiooni või initsiatsiooniga seotud defektidele ja RNA pol II osalusele kromatiini transkriptsiooniseoselises modifitseerimises. Kuna töös uuriti *rpb9* deletsiooniga histoonimutante, võiks eeldada, et Rpb9 kui RNA pol II subühik on vajalik transkriptsiooni aktivatsiooniks või initsiatsiooniks vajalike valkude kromatiinile toomiseks. Teiseks võimaluseks oleks, et Rpb9 osaleb ise nukleosoomi seisundi hindamises, aga arvestades transkriptsiooni initsiatsioonil osalevate valkude suurt hulka on esimesena välja pakutud Rpb9 kui vahendaja rolli variant tõenäolisem.

KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli uurida histoonide H3 ja H4 modifikatsioonide mõju RNA pol II subühiku 9 (Rpb9) deletsiooniga *S. cerevisiae* rakkude kasvukiirusele.

Töö tulemused näitasid, et histooni H3 positsioonide K4 ja K23 muteerimine põhjustab *rpb9Δ* rakkude generatsiooniaja pikenemist. H3K4 trimetüleerimine esineb promootoraladel ja geenide 5' regioonis ning selle tähtsus *rpb9Δ* rakkude kasvukiiruses võib viidata Rpb9 osalusele transkriptsiooni initsiatsioonil. Katsete käigus täheldati ka *rpb9Δ* H3K4R mutandi generatsiooniaja pikenemist sõltuvalt rakkude vanusest, mille uurimisele on plaanis tulevikus keskenduda. Histooni H3 positsiooni K23 atsetüleerimist läbi viiv atsetüültransferaas NuA3 tunneb ära promootoril esineva H3K4me3. H3K4 trimetüleerimise olulisus K23 atsetüleerimises ning ka asjaolu, et histoonide H3 ja H4 atsetüleerimine on vajalik edukaks transkriptsiooni aktivatsiooniks, viitavad taaskord Rpb9 subühiku rollile transkriptsiooni alustamises.

Saadud tulemused näitasid, et Rpb9-l võib olla suurem roll transkriptsiooni initsiatsioonil, kui seda varem arvatud on ning nende seoste edasine uurimine aitaks kaasa Rpb9 funktsiooni iseloomustamisele. Samuti andsid saadud tulemused informatsiooni RNA pol II ja histoonimodifikatsioonide äratundmise seoste kohta, viidates sellele, et Rpb9-l võib olla oluline roll histoonide modifikatsioonide lugevate või teostavate valkude töö vahendamises või otseselt RNA pol II kromatiiniga seostumises ja läbimises.

The impact of histone H3 and H4 mutations on RNA polymerase II dependant transcription in budding yeast.

Kristina Reinmets

SUMMARY

Eukaryotic genome is packaged into nucleoprotein complex called chromatin with nucleosome as it's fundamental structural unit. Nucleosomes consist of 147 bp of DNA wrapped around histone octamer – two copies of histones H2A, H2B, H3 and H4 each. Chromatin, serving both to protect the cell's genetic information and regulate gene expression through limiting the access to DNA, is the biggest obstacle RNA polymerase II has to overcome in order to perform efficient transcription. One way to loosen the interactions between basic histone proteins and DNA is by adding various chemical groups to the histones. These post-translational modifications can either directly regulate the protein-DNA interactions or serve as docking sites for chromatin-modifying proteins. Understanding the mechanisms of DNA accessibility regulation allowing chromatin-templated processes like transcription is needed as a fundamental knowledge to study the eukaryotic gene expression and it's disease-causing defects.

The aim of this study was to examine the impact of histone H3 and H4 mutations on RNA polymerase II dependant transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose, a nonessential subunit of RNA pol II called Rpb9 was deleted. *Rpb9* deletion causes slower growth rate compared to wildtype yeast cells, setting up a well-monitored phenotypical background to study the effect of histone H3 and H4 mutations on cell's growth.

The results showed that mutations of histone H3 residue K4 and K23 to arginine significantly extend the doubling time of *rpb9Δ* cells. Trimethylation of H3K4 is a hallmark of active promoters and the repressing effect of H3K4R mutation on *rpb9Δ* cells may refer to the transcription initiation defects. It was also noticed that extension of the doubling time of H3K4R

mutant correlated with the aging of cells. NuA3, the H3K23 acetyltransferase recognizes trimethylated H3K4, and since acetylation of histones H3 and H4 is needed for proper chromatin opening, it was suggested, that like H3K4R mutation, H3K23R may also refer to the transcription initiation error. Altogether, these results may show that the role of RNA pol II subunit Rpb9 in transcription initiation and chromatin reading is bigger than previously considered and needs further investigation.

KIRJANDUSE LOETELU

- Adam M, Robert F, Larochelle M, Gaudreau L. 2001. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* **21**: 6270–9.
- Ahmad K, Henikoff S. 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**: 1191–200.
- Altaf M, Auger A, Covic M, Côté J. 2009. Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochem Cell Biol* **87**: 35–50.
- Van Attikum H, Gasser SM. 2009. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* **19**: 207–17.
- Awrey DE, Weilbaecher RG, Hemming SA, Orlicky SM, Kane CM, Edwards AM. 1997. Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS. *J Biol Chem* **272**: 14747–54.
- Batta K, Zhang Z, Yen K, Goffman DB, Pugh BF. 2011. Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Genes Dev* **25**: 2254–65.
- Bedford MT, Richard S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**: 263–72.
- Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F, Allis CD. 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **15**: 3286–95.
- Bushnell DA, Kornberg RD. 2003. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6969–73.
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia W-J, Anderson S, Yates J, Washburn MP, et al. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**: 581–92.
- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Côté J. 2003. The diverse functions of histone

- acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321–9.
- Chen X, Ruggiero C, Li S. 2007. Yeast Rpb9 plays an important role in ubiquitylation and degradation of Rpb1 in response to UV-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* **27**: 4617–25.
- Cheung WL, Turner FB, Krishnamoorthy T, Wolner B, Ahn S-H, Foley M, Dorsey JA, Peterson CL, Berger SL, Allis CD. 2005. Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **15**: 656–60.
- Côté J, Richard S. 2005. Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J Biol Chem* **280**: 28476–83.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, et al. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545–53.
- Desmoucelles C, Pinson B, Saint-Marc C, Daignan-Fornier B. 2002. Screening the yeast “disruptome” for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* **277**: 27036–44.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**: 1001–4.
- Duan MR, Smerdon MJ. 2014. Histone H3 Lysine 14 (H3K14) Acetylation Facilitates DNA Repair in a Positioned Nucleosome by Stabilizing the Binding of the Chromatin Remodeler RSC (Remodels Structure of Chromatin). *J Biol Chem* **289**: 8353–63.
- Duan R, Rhie B-H, Ryu H-Y, Ahn SH. 2013. The RNA polymerase II Rpb4/7 subcomplex regulates cellular lifespan through an mRNA decay process. *Biochem Biophys Res Commun* **441**: 266–70.
- Dudley AM, Janse DM, Tanay A, Shamir R, Church GM. 2005. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol Syst Biol* **1**: 2005.0001.
- Feaver WJ, Gileadi O, Li Y, Kornberg RD. 1991. CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell* **67**: 1223–30.
- Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW. 2011. Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol* **7**:

113–9.

- Fleming AB, Kao C-F, Hillyer C, Pikaart M, Osley MA. 2008. H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* **31**: 57–66.
- Fuchs SM, Larabee RN, Strahl BD. 2009. Protein modifications in transcription elongation. *Biochim Biophys Acta* **1789**: 26–36.
- Furter-Graves EM, Furter R, Hall BD. 1991. SHI, a new yeast gene affecting the spacing between TATA and transcription initiation sites. *Mol Cell Biol* **11**: 4121–7.
- Furter-Graves EM, Hall BD, Furter R. 1994. Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic Acids Res* **22**: 4932–6.
- Furuyama T, Henikoff S. 2009. Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell* **138**: 104–13.
- Gangloff YG, Romier C, Thuault S, Werten S, Davidson I. 2001. The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci* **26**: 250–7.
- Gibney PA, Fries T, Bailer SM, Morano KA. 2008. Rtr1 is the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins. *Eukaryot Cell* **7**: 938–48.
- Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL. 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* **274**: 5895–900.
- Green MR. 2000. TBP-associated factors (TAFIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci* **25**: 59–63.
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Lüscher B, Amati B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**: 933–7.
- Hahn S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 394–403.
- Hanes SD. 2014. The Ess1 prolyl isomerase: Traffic cop of the RNA polymerase II transcription cycle. *Biochim Biophys Acta*.

- Harel-Sharvit L, Eldad N, Haimovich G, Barkai O, Duek L, Choder M. 2010. RNA Polymerase II Subunits Link Transcription and mRNA Decay to Translation. *Cell* **143**: 552–563.
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL. 2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**: 369–79.
- Hemming SA, Edwards AM. 2000. Yeast RNA polymerase II subunit RPB9. Mapping of domains required for transcription elongation. *J Biol Chem* **275**: 2288–94.
- Hemming SA, Jansma DB, Macgregor PF, Goryachev A, Friesen JD, Edwards AM. 2000. RNA polymerase II subunit Rpb9 regulates transcription elongation in vivo. *J Biol Chem* **275**: 35506–11.
- Hsin J-P, Manley JL. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**: 2119–37.
- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu R-M. 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**: 748–51.
- Hull MW, McKune K, Woychik NA. 1995. RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev* **9**: 481–90.
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S. 2002. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**: 2080–3.
- Kadonaga JT. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**: 40–51.
- Kasten M, Szerlong H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Werner M, Cairns BR. 2004. Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J* **23**: 1348–59.
- Keogh M-C, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ, et al. 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**: 593–605.
- Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Vermeulen M, Mann M, Bähler J, Green RD, Kouzarides T. 2007. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4

- trimethylation. *Nature* **449**: 928–32.
- Knippa K, Peterson DO. 2013. Fidelity of RNA polymerase II transcription: Role of Rbp9 in error detection and proofreading. *Biochemistry* **52**: 7807–17.
- Kornberg RD. 1977. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* **46**: 931–54.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.
- Latham JA, Dent SYR. 2007. Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1017–24.
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**: 73–84.
- Lee KK, Workman JL. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 284–95.
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**: 91–5.
- Li S, Chen X, Ruggiero C, Ding B, Smerdon MJ. 2006a. Modulation of Rad26- and Rpb9-mediated DNA repair by different promoter elements. *J Biol Chem* **281**: 36643–51.
- Li S, Ding B, Chen R, Ruggiero C, Chen X. 2006b. Evidence that the transcription elongation function of Rpb9 is involved in transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 9430–41.
- Li S, Smerdon MJ. 2004. Dissecting transcription-coupled and global genomic repair in the chromatin of yeast GAL1-10 genes. *J Biol Chem* **279**: 14418–26.
- Li S, Smerdon MJ. 2002. Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**: 5921–9.
- Li Y, Flanagan PM, Tschochner H, Kornberg RD. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* **263**: 805–7.
- Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ. 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* **3**: e328.

- Liu X, Bushnell DA, Silva D-A, Huang X, Kornberg RD. 2011. Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science* **333**: 633–7.
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL. 2001. Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**: 1142–6.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–60.
- Martin DGE, Grimes DE, Baetz K, Howe L. 2006. Methylation of histone H3 mediates the association of the NuA3 histone acetyltransferase with chromatin. *Mol Cell Biol* **26**: 3018–28.
- McKune K, Moore PA, Hull MW, Woychik NA. 1995. Six human RNA polymerase subunits functionally substitute for their yeast counterparts. *Mol Cell Biol* **15**: 6895–900.
- Megee PC, Morgan BA, Mittman BA, Smith MM. 1990. Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* **247**: 841–5.
- Meyer PA, Ye P, Suh M-H, Zhang M, Fu J. 2009. Structure of the 12-subunit RNA polymerase II refined with the aid of anomalous diffraction data. *J Biol Chem* **284**: 12933–9.
- Mischo HE, Proudfoot NJ. 2013. Disengaging polymerase: terminating RNA polymerase II transcription in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 174–85.
- Mujtaba S, Zeng L, Zhou M-M. 2007. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**: 5521–7.
- Van Mullem V, Wery M, Werner M, Vandehaute J, Thuriaux P. 2002. The Rpb9 subunit of RNA polymerase II binds transcription factor TFIIE and interferes with the SAGA and elongator histone acetyltransferases. *J Biol Chem* **277**: 10220–5.
- Nagy Z, Tora L. 2007. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**: 5341–57.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, et al. 2006. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting

- histone modifications. *Genes Dev* **20**: 966–76.
- Nelson CJ, Santos-Rosa H, Kouzarides T. 2006. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**: 905–16.
- Nesser NK, Peterson DO, Hawley DK. 2006. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3268–73.
- Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA, Struhl K. 2003. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1820–5.
- Olins AL, Olins DE. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**: 330–2.
- Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, Reinberg D. 2006. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* **125**: 703–17.
- Phillips DM. 1963. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J* **87**: 258–63.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, et al. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**: 517–27.
- Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**: 575–608.
- Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. 2012. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**: 565–83.
- Rhee HS, Pugh BF. 2012. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* **483**: 295–301.
- Robzyk K, Recht J, Osley MA. 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**: 501–4.
- Runner VM, Podolny V, Buratowski S. 2008. The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol Cell Biol* **28**: 1883–91.

- Sainsbury S, Niesser J, Cramer P. 2013. Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex. *Nature* **493**: 437–40.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 557–67.
- Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**: 138–41.
- Shieh GS, Pan C-H, Wu J-H, Sun Y-J, Wang C-C, Hsiao W-C, Lin C-Y, Tung L, Chang T-H, Fleming AB, et al. 2011. H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC Genomics* **12**: 627.
- Smart SK, Mackintosh SG, Edmondson RD, Taverna SD, Tackett AJ. 2009. Mapping the local protein interactome of the NuA3 histone acetyltransferase. *Protein Sci* **18**: 1987–97.
- Smolle M, Workman JL. 2013. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 84–97.
- Sobel RE, Cook RG, Perry CA, Annunziato AT, Allis CD. 1995. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1237–41.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–5.
- Sun ZW, Tessmer A, Hampsey M. 1996. Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 2560–6.
- Talbert PB, Henikoff S. 2010. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 264–75.
- Tsai W-W, Wang Z, Yiu TT, Akdemir KC, Xia W, Winter S, Tsai C-Y, Shi X, Schwarzer D, Plunkett W, et al. 2010. TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature* **468**: 927–32.
- Vezzoli A, Bonadies N, Allen MD, Freund SM V, Santiveri CM, Kvinlaug BT, Huntly BJP, Göttgens B, Bycroft M. 2010. Molecular basis of histone H3K36me3 recognition by the PWWP domain of Brpf1. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 617–9.

- Walmacq C, Kireeva ML, Irvin J, Nedialkov Y, Lubkowska L, Malagon F, Strathern JN, Kashlev M. 2009. Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *J Biol Chem* **284**: 19601–12.
- Wang X, Hayes JJ. 2008. Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol* **28**: 227–36.
- Widom J, Klug A. 1985. Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell* **43**: 207–13.
- Williams SP, Athey BD, Muglia LJ, Schappe RS, Gough AH, Langmore JP. 1986. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J* **49**: 233–248.
- Wittschieben BO, Fellows J, Du W, Stillman DJ, Svejstrup JQ. 2000. Overlapping roles for the histone acetyltransferase activities of SAGA and elongator in vivo. *EMBO J* **19**: 3060–8.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, et al. 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**: 267–74.
- Woodcock CL, Frado LL, Rattner JB. 1984. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol* **99**: 42–52.
- Woychik NA, Lane WS, Young RA. 1991. Yeast RNA polymerase II subunit RPB9 is essential for growth at temperature extremes. *J Biol Chem* **266**: 19053–5.
- Xiao T, Kao C-F, Krogan NJ, Sun Z-W, Greenblatt JF, Osley MA, Strahl BD. 2005. Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **25**: 637–51.
- Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H. 2006. P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* **21**: 227–37.

LISAD

Lisa 1. Kasutatud pRS413 seeria plasmiidid (CEN, HIS3)

	Plasmiid	Kodeeritavad histoonid
1	pRS413-H3H4-3F12	H3-3F12; H4
2	pRS413-H3H4-3F12-H3K4R	H3K4R-3F12; H4
3	pRS413-H3H4-3F12-H3K9R	H3K9R-3F12; H4
4	pRS413-H3H4-3F12-H3K14R	H3K14R-3F12; H4
5	pRS413-H3H4-3F12-H3K18R	H3K18R-3F12; H4
6	pRS413-H3H4-3F12-H3K23R	H3K23R-3F12; H4
7	pRS413-H3H4-3F12-H3K27R	H3K27R-3F12; H4
8	pRS413-H3H4-3F12-H3K36R	H3K36R-3F12; H4
9	pRS413-H3H4-3F12-H3K56R	H3K56R-3F12; H4
10	pRS413-H3H4-3F12-H3K56Q	H3K56Q-3F12; H4
11	pRS413-H3H4-3F12-H3K79R	H3K79R-3F12; H4
12	pRS413-H3H4-3F12-H3T3A	H3T3A-3F12; H4
13	pRS413-H3H4-3F12-H3S10A	H3S10A-3F12; H4
14	pRS413-H3H4-3F12-H3S28A	H3S28A-3F12; H4
15	pRS413-H3H4-3F12-H4K5R	H3-3F12; H4K5R
16	pRS413-H3H4-3F12-H4K8R	H3-3F12; H4K8R
17	pRS413-H3H4-3F12-H4K12R	H3-3F12; H4K12R
18	pRS413-H3H4-3F12-H4K16R	H3-3F12; H4K16R
19	pRS413-H3H4-3F12-H4K20R	H3-3F12; H4K20R
20	pRS413-H3H4-3F12-H4K91R	H3-3F12; H4K91R
21	pRS413-H3H4-3F12-H4K12;16R	H3-3F12; H4K12;16R

Lisa 2. Kasutatud pärmitüvede tabel

Tüvi	Genotüüp
W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100R lys2</i>
AKY217	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> Y Cp50: <i>hht2-hhf2</i> (saadud tüvest DY5733, (Wittschieben et al. 2000))
AKY696	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> Y Cp50: <i>hht2-hhf2</i>
AKY801	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12(HIS3)]
AKY802	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K4R (HIS3)]
AKY803	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K14R (HIS3)]
AKY804	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K18R (HIS3)]
AKY805	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K27R (HIS3)]
AKY806	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K36R (HIS3)]
AKY807	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K56R (HIS3)]
AKY808	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K79R (HIS3)]
AKY809	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3S10A (HIS3)]
AKY810	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3S28A (HIS3)]
AKY811	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> <i>rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K5R (HIS3)]

AKY812	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K8R (<i>HIS3</i>)]
AKY813	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K12R (<i>HIS3</i>)]
AKY814	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K20R (<i>HIS3</i>)]
AKY815	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K16R (<i>HIS3</i>)]
AKY816	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K91R (<i>HIS3</i>)]
AKY817	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H4K12;16R (<i>HIS3</i>)]
AKY818	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K23R (<i>HIS3</i>)]
AKY819	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K56Q (<i>HIS3</i>)]
AKY820	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3T3A (<i>HIS3</i>)]
AKY861	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6</i> [pRS413- H3H4-3F12-H3K9R (<i>HIS3</i>)]
AKY821	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>)]
AKY822	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K4R (<i>HIS3</i>)]
AKY823	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K14R (<i>HIS3</i>)]
AKY824	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K18R (<i>HIS3</i>)]
AKY825	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K27R (<i>HIS3</i>)]
AKY826	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K36R (<i>HIS3</i>)]

AKY827	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::leu</i> <i>trp:gal-pr-vps13</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K56R (<i>HIS3</i>)]
AKY828	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K79R (<i>HIS3</i>)]
AKY829	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3S10A (<i>HIS3</i>)]
AKY830	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3S28A (<i>HIS3</i>)]
AKY831	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K5R (<i>HIS3</i>)]
AKY832	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K8R (<i>HIS3</i>)]
AKY833	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K12R (<i>HIS3</i>)]
AKY834	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K20R (<i>HIS3</i>)]
AKY835	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K16R (<i>HIS3</i>)]
AKY836	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K91R (<i>HIS3</i>)]
AKY837	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H4K12;16R (<i>HIS3</i>)]
AKY838	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K23R (<i>HIS3</i>)]
AKY839	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K56Q (<i>HIS3</i>)]
AKY840	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3T3A (<i>HIS3</i>)]
AKY862	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> <i>gal-pr-vps13::TRP1</i> <i>hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K9R (<i>HIS3</i>)]

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajaid Arnold Kristjuhanit ja Signe Värvi toetuse, kannatlikkuse ja hea juhendamise eest. Samuti tänan kõiki oma laborikaaslast ja teisi Rakubioloogia õppetooli teadlasi, kes on alati abivalmid ja avatud huvitavatele aruteludele.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristina Reinmets (sünnikuupäev: 28.12.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Histoonide H3 ja H4 mutatsioonide mõju RNA polümeraas II sõltuvale transkriptsioonile pagaripärmis“, mille juhendajad on Arnold Kristjuhan ja Signe Värvi,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014