

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

Mari Ann Rebane

**Histooni H3 mutantide ja *yaf9* deletsiooni koosmõju
pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) kasvule**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Bioloogia ja elustiku kaitse

Juhendaja PhD Signe Värv

TARTU 2022

INFOLEHT

Histooni H3 mutantide ja *yaf9* deletsiooni koosmõju pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) kasvule

Yaf9 on pagaripärmis (*S. cerevisiae*) YEATS-domeeni omav kahe kromatiini-seoselise kompleksi (SWR1-C, NuA4) subühik. Yaf9 pole pärmirakus hädavajalik, kuid selle deletsioon muudab rakud tundlikumaks DNA-d kahjustavate ainete suhtes ning on surmav kombinatsioonis H4K5,8,12R mutandiga. Käesolevas töös uuritakse histooni H3 post-translatsiooniliste modifikatsioonide ja Yaf9 vahelisi seoseid, kasutades nii plasmiidivahetussüsteemi kui ka metüültransferaaside deletsioonitüvesid. Leiti, et H3 metüleeritavate ja atsetüleeritavate lüsiinijääkidega mitmikmutatsioonid *yaf9Δ* tüves on letaalsed ning H3K23R ja H3K27 mutatsioonid pidurdavad pärmiraku kasvu. H3 metülatsiooniga seotud lüsiinijääkide üksikmutantide puhul ei nähtud samalaadset efekti.

Märksõnad: Yaf9, histoon H3, histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid, *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

The effect of combining histone H3 mutants and *yaf9* deletion on the growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Yaf9 is a YEATS-domain containing protein in baker's yeast (*S. cerevisiae*) and a subunit of two chromatin-related complexes (SWR1-C, NuA4). Yaf9 is not essential in the yeast cell, but its deletion makes the cells more sensitive to DNA-damaging substances and is lethal in combination with the H4K5,8,12R mutant. This work explores the relationship between post-translational modifications of histone H3 and Yaf9 using both plasmid exchange system and methyltransferase deletion strains. Multiple mutations in H3 lysine residues that can be methylated or acetylated were found to be lethal in the *yaf9Δ* strain and H3K23R and H3K27 mutations inhibited yeast cell growth. Individual mutants of H3 lysine residues associated with methylation did not show a similar effect.

Keywords: Yaf9, histone H3, histone post-translational modifications, *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Kromatiin.....	8
1.1.1. Nukleosoomid	9
1.1.2. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.....	10
1.1.2.1. Atsetüleerimine.....	11
1.1.2.2. Metüleerimine.....	12
1.1.2.3. Fosforüleerimine.....	13
1.1.3. Kromatiini modifitseerimine ja interaktsioonid teiste valkudega	14
1.1.3.1. NuA4	15
1.2. Yaf9	16
1.2.1. Yaf9-ga seotud histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Kasutatud pärmitüved	19
2.2.2. Kasutatud plasmiidid.....	20
2.2.3. Kasutatud söötmed	21
2.2.4. DNA eraldamine	22
2.2.5. PCR	22
2.2.5.1. <i>yaf9Δset1Δ</i> , <i>yaf9Δset2Δ</i> ja <i>yaf9Δdot1Δ</i> deletsioonitüvede valmistamine.....	22
2.2.5.2. Transformeeritud kolooniate kontroll PCR reaktsiooniga.....	23
2.2.6. Agaroosgelelektroforees.....	24
2.2.7. Plasmiidivahetussüsteem.....	24
2.2.7.1. Pagaripärmi transformeerimine	24
2.2.7.2. Transformeeritud plasmiidide ekspresseerumise kontroll.....	25

2.2.8. Sporulatsioon ja tetraadide analüüs.....	25
2.2.9. 10-kordsete lahjendusterea analüüs.....	25
2.3. Tulemused.....	26
2.3.1. <i>Yaf9</i> deletsiooni ja H3 mitmik-mutantide koosmõjul pidurdub pärmirakkude kasv ...	26
2.3.2. <i>Yaf9</i> deletsiooni ja H3K23R, H3K27R või H3K56R modifikatsioonide koosmõju pidurdab pärmiraku kasvu.....	27
2.3.3. <i>yaf9Δ</i> ja histooni H3 metülatsioonimutantide koosmõju uurimine.....	30
2.3.3.1. <i>yaf9Δset1Δ</i> , <i>yaf9Δset2Δ</i> ja <i>yaf9Δdot1Δ</i> deletsioonitüvede valmistamine.....	30
2.3.3.2. Metüültransferaasi <i>SET1</i> deletsioon <i>yaf9Δ</i> tüves aeglustab pärmiraku kasvu	32
2.3.3.3. Metüültransferaaside <i>dot1</i> , <i>set1</i> ja <i>set2</i> mitmikdeletsioonide ning <i>yaf9</i> deletsiooniga tüvede valmistamine.....	32
2.3.3.4. Metüültransferaaside ja <i>yaf9</i> deletsiooni koosmõju võrdluses üksikdeletsioonidega metsiktüüpi tüvedega.....	34
2.4. Arutelu	36
KOKKUVÕTE.....	39
SUMMARY	40
KIRJANDUSE LOETELU.....	42
LISAD	49
Lisa 1.....	49
Lisa 2.....	51
TÄNUAVALDUSED.....	52
LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – *5-fluoro orotic acid* (5-fluuro-oroothape)

ac – *acetylation* (atsetüleerimine)

ap – aluspaar

Asf1 – *anti-silencing factor 1* (vaigistamise vastane faktor)

C-terminaalne – *carboxyl terminal* (karboksüterminaalne)

DSB – *double strand break* (kaheahelaline katke)

H1 – histoon H1

H2A – histoon H2A

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H4 – histoon H4

HAT – *histone acetyltransferase* (histoonide atsetüültransferaas)

HDAC – *histone deacetylase* (histoonide deatsetülaas)

HMT – *histone methyltransferase* (histoonide metüültransferaas)

INO80 – *inositol requiring* (kromatiini remodelleeriv kompleks, mille deleteerimine põhjustab inositooli auksotroofiat)

K – lüsiin

MAT- *mating type* (paardumistüüp)

me – *methylation* (metüleerimine)

N-terminaalne – amino-terminaalne

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

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

PHD – *plant homeo domain* (taime homeodomeen, mis tunneb ära metüüllüsiine)

PTM – post-translatsiooniline modifikatsioon

R – arginiin

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

S – seriin

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

SWI/SNF – *switching defective/sucrose non-fermenting* (“ümberlülitusdefektiga/sahharoosi mittekääriv” – kromatiini remodelleerimiskompleks, mille funktsiooni kadu seostub paardumistüübi vahetamise ja sahharoosi metabolismi häiretega)

SWR1-C – *SWI2/SNF2-related 1 chromatin remodeling complex* (SWI/SNF2 perekonnaga sarnanev kromatiini remodelleeriv kompleks, mis vastutab histoonivariandi H2A.Z, pärms Htz1, ümberpaigutamise eest)

WT – *wildtype* (metsiktüüpi tüvi)

YEATS – *Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5* (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5 valkudes kirjeldatud valgudomeen)

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmie ekstrakt, pepton, dekstroos; kõiki pärmie eluks vajalikke komponente sisaldav pärmie sööde)

SISSEJUHATUS

Geneetilise informatsiooni kaitsmine ja edasikandmine on väga oluline iga elusorganismi jaoks. Eukariootsete organismide DNA asub rakutuumas, kus see on seoses valkudega. Moodustunud kompleksi nimetatakse kromatiiniks, mille põhiliseks struktuurseks kordusüksuseks on nukleosoom. Viimane moodustub, kui kaksikahelaline umbes 150 aluspaari pikkune DNA on 1,7-kordselt keerdunud ümber kaheksa aluselise histoonivalgu (kahes korduses H2A, H2B, H3 ja H4). Kromatiin on väga dünaamiline struktuur, mida saab muuta nii histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonide, nukleosoomide nihutamise kui ka eemaldamise kaudu.

Histoonidel on mitmeid post-translatsioonilisi modifikatsioone, millest enim uuritud on näiteks lüsiinijääkide atsetüleerimine, lüsiini- või arginiinijääkide metüleerimine ja seriini-, treoniini- või türosiinijääkide fosforüleerimine. Enamik modifikatsioonikohti asub histoonide N-terminustes, kuid need võivad paikneda ka C-terminaalsetes osades ning histoonide „keha“ piirkonnas. Need modifikatsioonid võimaldavad elektroosilise efekti kaudu muuta kromatiini rohkem või vähem kättesaadavaks erinevatele reguleerivatele elementidele, mõjutades seeläbi kõiki DNA-ga seotud protsesse ning on seondumiskohaks mittehistoonsetele valkkompleksidele. Pärmis leiduv Yaf9 on üks kolmest pärmi valgust, millel esineb YEATS-domeen, mis suudab seonduda atsetüleeritud lüsiinidega. Yaf9 on NuA4 (*nucleosomal acetyltransferase of H4*) kompleksi ning SWR1-C (*SWI2/SNF2-Related 1 Chromatin Remodeling Complex*) kompleksi subühik.

Käesolevas töös otsitakse seoseid *yaf9* Δ ja histooni H3 N-terminaalsete post-translatsiooniliselt modifitseeritavate aminohappejääkide mutatsioonide vahel. Kasutades mudelorganismina pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*), loodi mitmeid mutantsete histoonidega või puuduvate metüültransferaasidega ja *yaf9* Δ pärmitüvesid. Muteeritud H3 histoonis olid lüsiinijäägid vahetatud arginiinide vastu, kuivõrd arginiinijääke ei ole võimalik atsetüleerida. Seega on antud töö eesmärgiks uurida histooni H3 modifitseerivate aminohappejääkide mutatsioonide koostõju *yaf9* deletsiooniga pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) rakkude kasvukiirusele. Töö koostati Tartu Ülikooli Rakubioloogia õppetoolis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kromatiin

Kromatiiniks nimetatakse eukariootse raku tuumas olevat korrapäraselt organiseerunud DNA-d, mis on seoses valkudega. Kõige väiksemat struktuurset üksust kromatiinis nimetatakse nukleosoomiks. Nukleosoom formeerub, kui kaksikahelaline negatiivselt superspiraliseerunud DNA keerdub 1,7 korda, umbes 150 aluspaari pikkuselt, ümber kaheksa positiivselt laetud histooni valgu (kahes korduses H2A, H2B, H3, H4). Nukleosoomid on omakorda ühenduses lühikese *linker*-DNA-ga, mis aitab moodustuda ~10 nm läbimõõduga „pärlikee“ struktuuril, mida peetakse kromatiini esmaseks pakkimistasemeks (Piatti *et al.*, 2011). Edasine kondenseerumise aste on 30 nm läbimõõduga fiiber. Järgnevad pakkimisastmed kujunevad mittehatoonsete valkude kaasabil ning kõrgeim tase on valgusmikroskoobist nähtav 700 nm diameetriga mitotoiline kromosoom (Maeshima ja Eltsov, 2008).

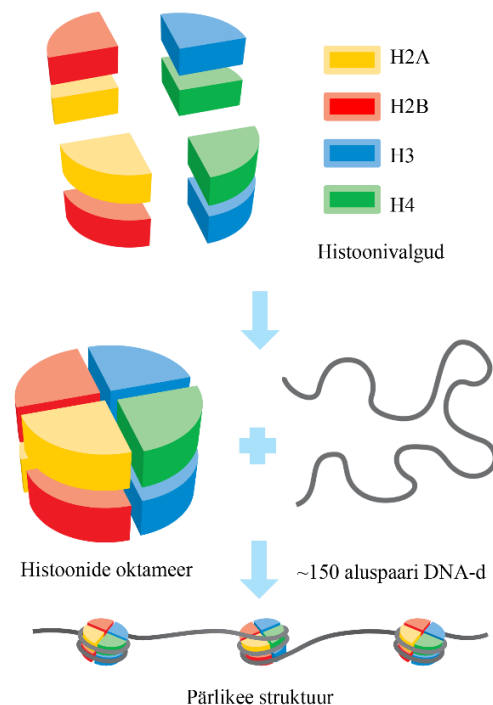
Taoline organiseeritud ja paindlik kromatiini pakkimine kaitseb DNA-d ja on väga oluline erinevate reguleerivate komplekside juurdepääsuks. Peamiselt liigitatakse funktsionaalsuse alusel kromatiin hetero- ja eukromatiiniks. Esimene on piirkond genomist, mis on väga kompaktselt kokku pakitud ja seeläbi transkriptsiooniliselt valdavalt inaktiivne. Heterokromatiin on tihti metüleeritud ning DNA on nukleaaasidele kättesaamatu (Schulze *et al.*, 2010). Sellest tulenevalt on heterokromatiniseerunud alad geenivaesed ning asetsevad peamiselt korduvate järjestustega piirkondades, milleks on näiteks telomeerid ja rDNA lookus. Pärmis on lisaks heterokromatiinse struktuuriga ka paardumistüübi lookused. Eukromatiin seevastu on sageli atsetüleeritud, rohkem avatud, enamasti geenirohke ja aktiivselt transkribeeritav. Seega kromatiini lokaalne modelleerimine on võimalus erinevate geenide ekspressiooni reguleerimiseks (Quina *et al.*, 2006).

Kromatiini ümberkorralduste eest vastutavad erinevad valkkompleksid. Ühte gruppi kuuluvad ATP-sõltuvad valkkompleksid (SWI/SNF-RSC). Need on seotud nukleosoomide ümberpaigutamise või eemaldamisega, kuna nukleosoomid võivad toimida kui geenirepressorid, varjates tähtsaid reguleerivaid DNA järjestusi (Lorch ja Kornberg, 2015). Taolised suured valgukompleksid koosnevad sageli ATPaasist, mis kuulub „sahharoosi mitte fermenteeriva 2“ (*sucrose non-fermenting 2*, SNF2) ATPaaside või helikaaside perekonda (Flaus *et al.*, 2006;

Piatti *et al.*, 2011). Enim uuritud ATP-sõltuvad valkkompleksid kuuluvad kas SWI/SNF (*switch/sucrose non-fermenting*), ISWI (*imitation switch*), CHD (*chromo helicase DNA binding*) või INO80 (*inositol auxotroph 80*) alaperekonda (Piatti *et al.*, 2011). Teise gruppi kuuluvad valkkompleksid aga mõjutavad kromatiini struktuuri histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonide kaudu (SAGA, NuA4).

1.1.1. Nukleosoomid

Nukleosoomi südamiku moodustab histoonide oktameer, mis täpsemini assambleerub H3-H4 tetrameerist, kuhu kinnituvad kaks H2A-H2B dimeeri (Luger *et al.*, 1997), (Joonis 1). Lisaks võib kõrgematel eukarüootidel esineda histoon H1, mis seondub nukleosoomi südamike vahele jääva *linker*-DNA-ga. Histoonid on eukarüootide hulgas kõrgelt konserveerunud võrdlemisi väikesed aluselised valgud (11-15 kDa), kus suurem osa massist koondub C-terminusse α -heeliksi näol. DNA keerdub 1,7-kordselt ümber histooni voldi domeeni (*histone fold*), mis asub α -heeliksistest moodustunud sambas ja millest moodustub nukleosoomi „keha“. Histoonide N-



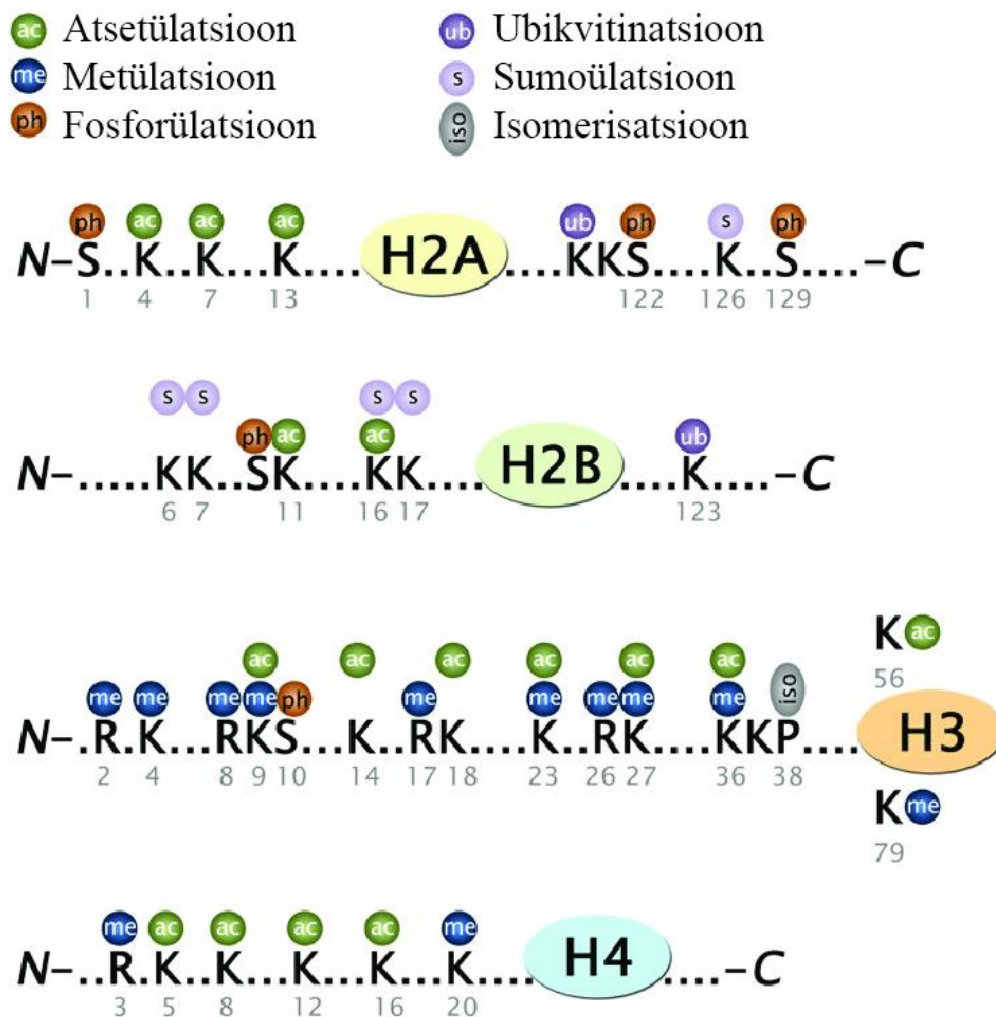
Joonis 1. Nukleosoomi struktuur. Nukleosoom koosneb kaheksast histoonivalgust (kahe korduses H2A, H2B, H3, H4), ümber mille on keerdunud ~150 aluspaari pikkune DNA. Järjestikused nukleosoomid moodustavad omakorda nn “pärlikee struktuuri”. Modifitseeritud joonis allikast (Morgan, 2006)

terminaalsed alad ehk „sabad“ ulatuvad südamikust välja ja moodustavad ligikaudu 25-30% nukleosoomi keha massist. Histonide sabad on evolutsiooniliselt konserveerunud, kuid struktureerimata, koosnedes umbes 15-30 aminohappejäägist, millest ülekaalus on lüsiinid ja arginiinid. (Cutter ja Hayes, 2015)

Lisaks eelnevalt mainitud neljale histoonile leidub veel histoonivariante. Nii H2A, H2B, H3 kui ka H1 valguperekonnas esineb alternatiivseid vorme. Eriti uuritud on H2A perekond, kuhu kuuluvad näiteks makroH2A, H2A.X, H2A.Bbd ja H2A.Z vormid. Valk H2A.Z (pärmis Htz1) osaleb transkriptsioonikontrollil, DNA parandamisel ja tsentromeerse heterokromatiini regulatsioonil (Giaino *et al.*, 2019). Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) esineb histooni H3 variant Cse4p, mis on koos histooniga H4 funktsionaalsete tsentromeeride komponendid (Meluh *et al.*, 1998).

1.1.2. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid (PTM) mõjutavad kromatiini struktuuri muutuste kaudu DNA-ga seotud erinevaid protsesse (Gujral *et al.*, 2020). Peamiselt leiavad erinevad modifikatsioonid aset histoonisabade N- või C-terminaalsetes piirkondades (Joonis 2), kuid neid esineb ka mõne histooni „keha“ regioonis. Enim uuritud PTM-d on lüsiinide (K) atsetüülimine ja metüleerimine, arginiinide (R) metüleerimine ning seriinide (S) ja treoniinide (T) fosforüülimine (Peterson ja Laniel, 2004). Need pole aga ainsad PTM-d, histoonide sabasid on võimalik ubikvineerida, krotonüleerida, suksinüleerida, sumoüleerida, adenüleerida jne (Tan *et al.*, 2011). Käesoleva töö käigus uuriti histooni H3 lüsiine asukohtadel 9, 14, 18, 23, 27, 56 ning seriini 10. Lüsiinid, mis tavaliselt on atsetüleeritud olekus, olid asendatud arginiiniga, et muuta nad mitteatsetüleeritavateks. Seriin 10 oli asendatudalaniiniga, et seda positsiooni poleks võimalik fosforüleerida.



Joonis 2. Pärmsis leiduvad histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid. Joonisel on välja toodud histoonide N- ja C-terminaalsete sabade aminohappejääkide positsioonid ning nende võimalikud modifikatsioonid. Modifitseeritud joonis allikast (Smolle ja Workman, 2012).

1.1.2.1. Atsetüleerimine

Lüsiinide atsetüleerimine neutraliseerib positiivse laengu ja vähendab histoonide ning DNA fosfaatrühmade vahelisi interaktsioone, lisades steerilisi takistusi. Nii muutub kromatiini struktuur avatumaks ja see reguleerib näiteks DNA transkriptsioonilist aktiivsust, mistõttu on atsetüleerimine üks uuritumaid modifikatsioone. Hüperatsetüleerimine võib pärssida kromatiini 30 nm fiibri teket (McCullough ja Dolinoy, 2018). Atsetüleerimist viivad läbi atsetüültransferaasid (*histone acetyltransferases*, HATs), mis lisavad atsetüülkoensüüm A-lt atsetüülgrupi lüsiinide ϵ -aminorühmale (Allfrey *et al.*, 1964). Atsetüleerimise pöördprotsessi, deatsetüleerimist teostavad deatsetülaasid (*histone deacetylases*, HDACs) (Barnes *et al.*, 2019).

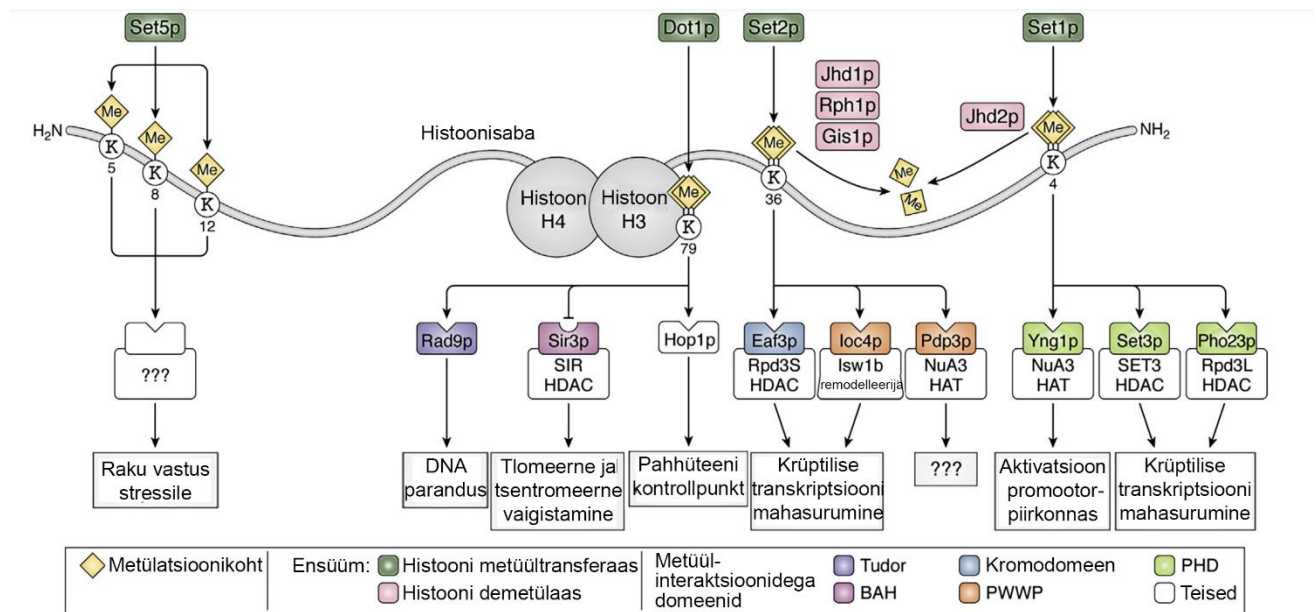
Atsetüleerimine on väga oluline ka kaksikahelaliste DNA katkete (*double-strand breaks*, DSB) parandamisel. DSB piirkondades toimub histoonide atsetüleerimine selleks, et SWI/SNF perekonna kromatiini remodelleerijad saaksid DNA-le kinnituda ja kromatiini avada, mis omakorda tagab ligipääsu DNA parandamist läbiviivatele valkudele (McCullough ja Dolinoy, 2018).

DNA kahjustuste parandamisel ja transkriptsioonil mängib olulist rolli H3K56 atsetülatsioon. Mainitud atsetülatsiooni viib läbi HAT Rtt109. Viimane on suuteline H3K56 atsetüleerima vaid siis, kui on moodustunud katalüütiliselt aktiivne kompleks histooni tšaperoni Vps75-ga. Rakud, kus puudub HAT, mis vastutab H3K56ac eest, on väga tundlikud DNA-d kahjustavate ainete osas (Burgess *et al.*, 2010; Cote *et al.*, 2019). H3K56ac on seotud aga H3K14 atsetülatsiooniga. Kui SAGA atsetüleerib H3 lüsiinijäägi 14, siis aitab see omakorda kromatiinile tuua SWI/SNF kompleksi. Viimane hõlbustab juurdepääsu Asf1-le, võimaldades seega Rtt109–Vps75-l H3K56 atsetüleerida (Cote *et al.*, 2019). Histooni H3K9 atsetüleerimine on seotud kasvu edendamisega. Tingimustes, kus on vähe glükoosi, kaob pärmis atsetüleeritud H3K9 tavapäraest kasvu soodustavatest geenidest ja muutub leitavaks geenidest, mis on seotud glükoneogeneesi ning rasvhapete oksüdatsiooni radadega (Wong, 2022). Seega aitab H3K9ac toime tulla pärmirakul tingimustes, kus glükoosi leidub vaid limiteeritud kogustes. Histooni H3 lüsiinijäägi atsetülatsioon positsioonil 18 on oluline meioosi algatamisel, kuna mutantsed pärmitüved, kus puudub H3K18 atsetülatsioon, ei suutnud meioosi alustada (Shi *et al.*, 2021).

1.1.2.2. Metüleerimine

Histoonide metüleerimine on vahendatud metüültransferaaside poolt, mis lisavad metüülgrupi samuti lüsiinijääkide ϵ -aminorühmale, kuid metüülatsioon ei neutraliseeri positiivset laengut (Burks *et al.*, 2020). Metüültransferaasid (*histone methyltransferases*, HMTs) võivad histoonide N-terminaalsete sabade arginiini jääke nii mono- kui ka dimetüleerida, lüsiinijääkidele lisada mono-, di- või trimetüülrühma ja demetülaasid (*histone demethylases*, HDMs) võivad need märgised eemaldada (Krebs, 2007), (Joonis 3). Ensüümid Set1, Set2, Set5 ja Dot1 on pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) lüsiini metüültransferaasideks (*lysine methyltransferase*, KMT) (Separovich ja Wilkins, 2021). Mainitud KMT-d on kõrge spetsiifilisusega, see tähendab, et lüsiinijääke metüleerivad erinevad valkkompleksid. Set1 metüleerib histooni H3 lüsiinijäägi positsioonil 4, Set2 vastutab H3K36 metüülatsiooni ja Dot1 H3K79 eest (Green *et al.*, 2012). Metüültransferaas Set5 saab lisada monometüülrühma histooni

H4 kolmele lüsiinijäägile (H4K5/8/12me1) (Separovich ja Wilkins, 2021). Demetülaasidest on leitud pagaripärmis samuti neli ensüümi: Jhd1, Jhd2, Rph1 ja Gis1 (Tu *et al.*, 2007). Kuigi enamasti on metüleerimine seotud geenivaigistamisega, siis pole see alati nii. Pärmis genoomi piirkondades, kus toimub aktiivne transkriptsioon, on täheldatud rohkem monometüülühme lisamist H3K9-le, kuid puudub H3K9 dimetüülatsioon (Lachner *et al.*, 2003). Inimeses on H3K4 metüleerimine eukromatiiniga korreleeruv tähis ja arginiinide metüleerimine histoonides H3 ja H4 viib transkriptsiooni aktiveerimiseni (Quina *et al.*, 2006).



Joonis 3. Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) leiduvad histoonide metüleerijad ja demetüleerijad ning protsessid, mida nad mõjutavad. Metüülatsioonikohad on kujutatud kollaste “teemantitena”. Histoonte metüültransferaasid on tumerohelisel taustal, demetülaasid roosal taustal. Visualiseerimise hõlbustamiseks on näidatud vaid üks histoonide H3 ja H4 koopia ning histoonide H2A ja H2B mõlemad koopiad on välja jäetud. Modifitseeritud joonis allikast (Separovich ja Wilkins, 2021).

1.1.2.3. Fosforüleerimine

Valkudel on fosforüleerimine väga levinud modifikatsioon ja kuigi histoonidel tuleb seda harvemini ette, on see siiski väga oluline PTM. Fosforüleerimist viivad läbi kinaasid ja defosforüleerimist fosfataasid. Histoonte H3 seriin 10 jäägi fosforüülimine on oluline kromosoomide kondenseerumiseks ja edukaks rakutsükli läbimiseks (Nowak ja Corces, 2004). Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) on väga tähtsal kohal H4S1 fosforüülatsioon

sporulatsiooni ajal, on näidatud et H4S1A mutatsioon alandab sporulatsiooni efektiivsust (Krishnamoorthy *et al.*, 2006).

1.1.3. Kromatiini modifitseerimine ja interaktsioonid teiste valkudega

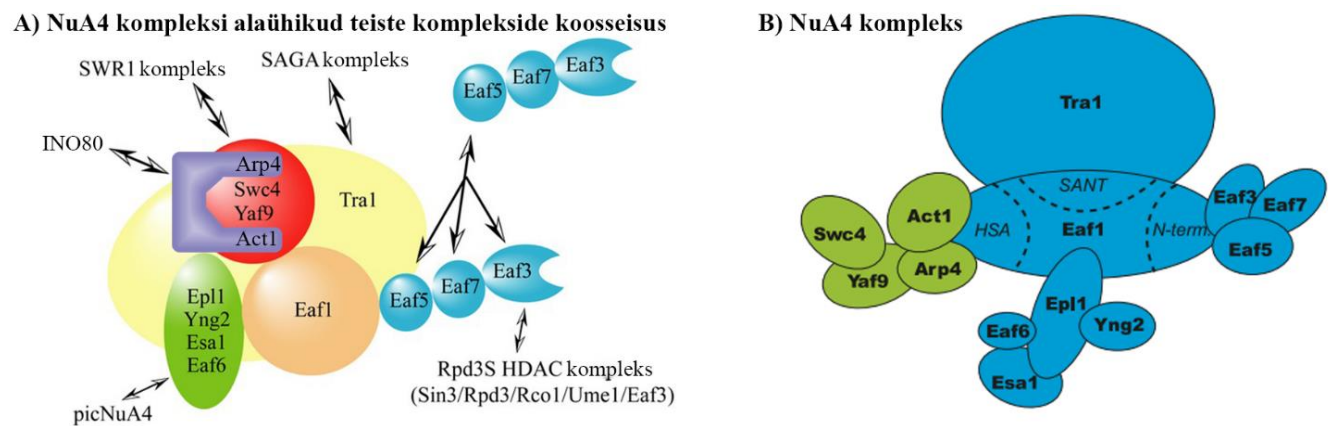
Kromatiiniga ühilduvad valkkompleksid saab jaotada kolme gruppi. Esimesed on ensüümid, mis suudavad kromatiinile „kirjutada“ (*writers*) ehk lisada histoonidele post-translatsioonilisi modifikatsioone. „Kirjutajateks“ on näiteks atsetüül- ja metüültransferaasid (HAT, HMT). Teised on „kustutajad“ (*erasers*), mis eemaldavad eelnevalt mainitud ensüümide paigaldatud PTM-e (HDM, HDAC). Kolmandasse gruppi kuuluvaid ensüüme või ensüümide komplekse võib nimetada „lugejateks“ (*readers*), mis tunnevad ära spetsiifilised PTM-d ja nendega seondudes võivad suunata transkriptsiooni kulgemist (Gillette ja Hill, 2015). Taolistel efektorvalkudel esineb mitmeid domeene, millel on kas katalüütiline aktiivsus või mis suudavad identifitseerida ja seonduda histoonide PTM piirkondadega (Schulze *et al.*, 2010).

Esimesena avastati seos bromodomeeni kohta, mis tunneb ära atsetüleeritud lüsiinijääke (de la Cruz *et al.*, 2005). Inimestel on 46 bromodomeeni sisaldavat valku ja kuigi aminohappelised järjestused võivad erineda, esineb kõigil neljast α -heeliksist moodustunud vort (Li *et al.*, 2014). Metüleeritud lüsiinijääke tunnevad ära kromodomeen ning taime homeodomeen ehk PHD (*Plant homeodomain*) (Krebs, 2007). Kromodomeenid võivad samas lisaks metüüllüsiinidele seonduda ka mõningate DNA või RNA järjestustega (de la Cruz *et al.*, 2005). Tudor domeen avastati äädikakärbsse (*Drosophila melanogaster*) Tudor valgust. See domeen saab lisaks histoonide metüleeritud arginiinidele seonduda RNA-ga (Pek *et al.*, 2012). YEATS-domeen (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5) on samuti atsüleeritud lüsiine siduv kompleks, kuid krotonüleeritud aminohappejääkide eelistusega (Zhao *et al.*, 2017). See valgudomeen on kõikides eukarüootides väga konserveerunud ning seda on leitud enam kui sajas valgus. Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) omavad YEATS-domeeni valgud Yaf9, Taf14 ja Sas5. Inimeses esineb YEATS-domeen valkudel GAS41, ENL ja AF9 (Schulze *et al.*, 2009). Paljud HAT-d vajavad katalüütilise aktiivsuse saavutamiseks teiste valkude kaasabi, koaktivaatoreid või isegi teisi HAT-e. Moodustunud kompleksidel on seega tihtilugu mitmeid kromatiini siduvaid domeene. Pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) leiduv kompleks SAGA (Spt-Ada-Gcn5 atsetüültransferaas) omab nii bromo-, kromo-, Tudori, SANT, SWIRM, WD40 kui ka PHD-domeene (McCullough ja Dolinoy, 2018). Lisaks leidub pärmis veel teisigi komplekse, mis

omavad rohkelt erinevaid domeene, näiteks NuA4, NuA3 (Lee ja Workman, 2007; Mccullough ja Dolinoy, 2018).

1.1.3.1. NuA4

Pärmis vastutab NuA4 (*nucleosomal acetyltransferase of H4*) kompleks (Joonis 4) histoonide H4, teatud määral ka H2A ja H2A.Z N-terminaalsete sabade atsetüleerimise eest, on seotud transkriptsiooni initsiatsiooni ja aktivatsiooniga ning kaksikahelaliste DNA katkestuste parandamisega. Pärmis on NuA4 1,3 MDa suuruse massiga ja koosneb 13 alaühikust (Mccullough ja Dolinoy, 2018). Esa1 on kompleksi katalüütiline alaühik (Allard *et al.*, 1999). Pärmis on Esa1 vajalik komponent kaksikahelaliste DNA katkestuste parandamisel (Bird *et al.*, 2002). Tra1 kuulub fosfatidüülinositool kinaaside perekonda ning on ka SAGA kompleksi alaühik (Cheung ja Díaz-Santín, 2019). Tra1 kaudu saab NuA4 teha koostööd SAGA kompleksiga, mis koos hõlbustavad SWI/SNF kompleksil kromatiinile kinnituda (Mccullough ja Dolinoy, 2018). Act1 täidab pärmis aktiini rolli ja Arp4 on aktiinile sarnanev valk. Yng2 on vajalik DNA kahjustustele reageerimiseks ja valgu p53 poolse transkriptsiooni aktivatsiooniks (Doyon *et al.*, 2004). Veel tuvastatud alaühikud on järgnevad: Epl1, Eaf1, (Swc4)/Eaf2, Eaf3, Eaf5, Eaf6, Eaf7, Yaf9 (Espinosa-Cores *et al.*, 2020). Eaf6 leidub ka pärmi NuA3 (*nucleosomal acetyltransferase of H3*) kompleksis (Taverna *et al.*, 2006). Swc4, Yaf9, Arp4 ja Act1 on ka



Joonis 4. NuA4 kompleksi alaühikud ning nende kuuluvus teistesse kompleksidesse. A) Joonisel on näidatud NuA4 kompleksi alaühikute koosseisu teistes kompleksides. Modifitseeritud joonis allikast (Rossetto *et al.*, 2014). B) NuA4 skemaatiline ülesehitus koos erinevate domeenide asukohtadega. Modifitseeritud joonis allikast (Lu *et al.*, 2009).

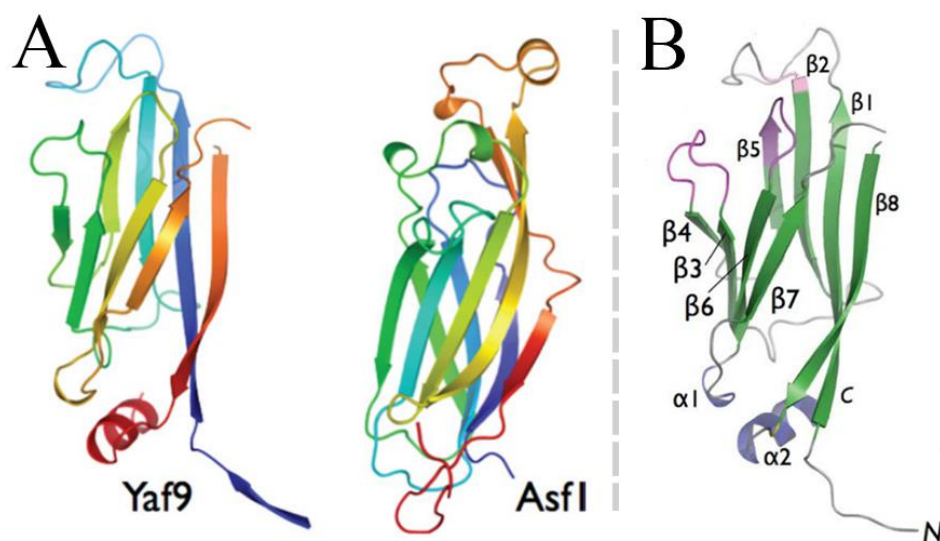
SWR1 kompleksi alaühikud, seega osalevad nad histoonide H2A-H2B dimeeride vahetuses H2A.Z-H2B dimeeride vastu (Gerhold ja Gasser, 2014).

1.2. Yaf9

Yaf9 (*Yeast AF9*) on saanud oma nime inimeses oleva YEATS-domeeni omava valguga AF9 järgi tänu BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) algoritmist saadud sarnastele tulemustele (Zhang *et al.*, 2004). Yaf9 on pärmi üks kolmest valgust, millel esineb YEATS-domeen, ta on kromatiini “lugeja” ja SWR1-C ning NuA4 alaühik. SWR1-C on ATP-sõltuv kompleks, mis vastutab histoonivariandi H2A.Z (pärmis Htz1) ümberpaigutamise eest (Lu *et al.*, 2009). NuA4 kompleksis pole Yaf9 hädavajalik, kuna *yaf9* deleteerimine ei mõjuta H4 üldist atsetüleerituse taset, kuid on näidatud, et *yaf9Δ* mutandid on hüpersensitiivsed mikrotoobuleid depolümeeriseerivate ainete suhtes (Le Masson *et al.*, 2003). SWR1-C kompleksis on Yaf9 vajalik Htz1 paigutamiseks geenidele, mis asuvad telomeeride läheduses, kuna *yaf9Δ* pärmitüvedes on täheldatud defektset Htz1 asetumist mainitud piirkonnas (Zhang *et al.*, 2004). *Yaf9* deletsiooniga pärmitüvede katsete põhjal on seostatud Yaf9 funktsioone transkriptsiooni reguleerimisega, histoonide atsetüleerimisega, DNA parandamisega ja kromosoomide korrektse segregatsiooniga. Täpsemalt on näidatud, et *yaf9* deletsiooniga pärmitüved on tundlikumad DNA-d kahjustavate ainete suhtes ja nad kasvavad aeglasemalt stressirohketes tingimustes (Klein *et al.*, 2018). Yaf9 on vajalik ka kasvuks madalamatel temperatuuridel, kuna *yaf9Δ* tüved 15 °C juures ei kasvanud (Zhang *et al.*, 2004). Samas normaaltingimustel pole täheldatud *yaf9Δ* tüvedel kasvuraskusi ega teisi defekte. Teised YEATS-domeeni omavad valgud pärmis, Sas5 ja Taf14, on samuti seotud atsetültransferaaside kompleksidega. Sas5 on Sas2 HAT kompleksi alaühik, Taf14 aga NuA3 HAT kompleksi alaühik. Taf14 on ka oluline komponent SWI/SNF ATPaasi kromatiini remodelleerimise kompleksis (Le Masson *et al.*, 2003).

Yaf9 N-terminaalses osas asuv YEATS-domeen koosneb kaheksast antiparalleelsest β -ahelast, mis on ühest otsast piiratud kahe lühikese α -ahelatega (Joonis 5). Moodustub „beetavõileib“, mis on iseloomulik immunoglobuliini (Ig) voldi perekonnale ning millel on kolm struktuurselt eristatavat üksust (Wang *et al.*, 2009). Esiteks asub Ig-voldi otsas, kahe katva α -heeliksi vastas kõrgelt konserveerunud lõhe. Teiseks, YEATS-domeeni N- ja C-terminuse juures asetseb suhteliselt madal vagu sügava hüdrofoobse taskuga, mis suudab eeldatavalt peptiide siduda ja moodustub osaliselt α -heeliksiste tõttu. Kolmandaks jääb nende kahe üksuse vahele ala, kus

paikneb palju laetud aminohapete jääke. Üleüldine Yaf9 YEATS-domeeni struktuur sarnaneb väga histoonide H3 ja H4 tšaperoni Asf1 vastavale domeenile. See seos seletab, miks Yaf9 nagu ka Asf1 on võimeline end siduma histoonidega H3 ja H4. On leitud, et kui pärmist eemaldada mõlemad mainitud valgud korraga, siis see pidurdab oluliselt pärmiraku kasvu, viidates nende valkude sarnastele tööülesannetele. Yaf9 YEATS-domeen on vajalik H2A.Z paigutamiseks spetsiifilistele promootorjärjestustele ning selle histoonivariandi atsetüleerimiseks. (Schulze *et al.*, 2010)



Joonis 5. Yaf9 YEATS-domeeni ja Asf1 tuuma struktuuri võrdlus. A) Mõlema valgu N-terminus algab siniste toonidega ning lõpeb punastes toonides C-terminusega. B) Yaf9 YEATS-domeeni täpsem kujutis. Näidatud on β -ahelate kulgemine ja „beetavõiveiva“ ühes otsas olevad kaks α -heeliksit. Modifitseeritud joonised allikast (Wang *et al.*, 2009).

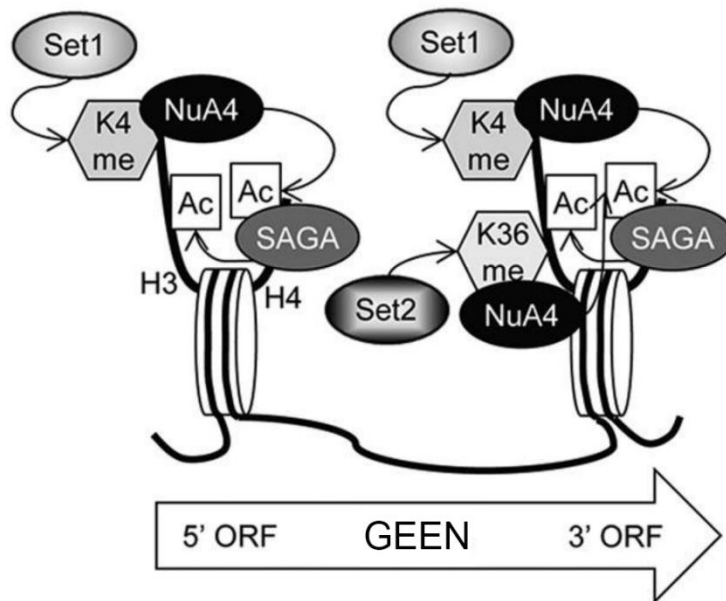
1.2.1. Yaf9-ga seotud histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

Histooni H3 lüsiinijäägi 56 atsetülatsioon on PTM, mida tavaliselt seostatakse Asf1-ga. Pärmirakkudel, milles on H3K56 mitteatsetüleeritavas vormis ning puudub *ASF1*, on avastatud kasvudefekt. Sarnane nähtus esineb rakkudel, milledes on *ASF1* asemel eemaldatud *YAF9*. See viitab asjaolule, et nii *YAF9* kui ka *ASF1* on seotud H3K56 atsetüleerimisega (Schulze *et al.*, 2010). On leitud, et Yaf9 homoloogi AF9 YEATS-domeen seondub tugevasti H3K9 atsetüleeritud peptiidiga, vähem aga H3K27 ja H3K18 atsetülatsioonidega (Li *et al.*, 2014). Yaf9 haakub atsetüülitud H3 histooniga, eelistades eelkõige sealset 27. positsioonil paiknevat

lüsiinjääki (Shanle *et al.*, 2015). Yaf9 YEATS-domeeni kristallstruktuuri uurides tuleb välja, et H3K27ac C-terminuse aminohappeline järjestus stabiliseerib kompleksi (Klein *et al.*, 2018).

Set1 ja Set2 on histoonide metüültransferaasid, mis vastutavad H3K4 ja H3K36 metülatsiooni eest. Set1 ja H3K4 metülatsioon on vajalikud rakkude normaalse kasvu säilitamiseks ja on seotud rDNA vaigistamisastmega (Briggs *et al.*, 2001). Histooni H3 metüleerimisel on tähtis roll nukleosoomide atsetüleerimise regulatsioonil (Joonis 6), mis on vahendatud NuA4 ja SAGA komplekside poolt, kuhu Yaf9 kuulub alaühikuna. Täpsemalt soodustab histooni H3 metülatsioon NuA4 kompleksil nukleosoomidega seondumist ning NuA4 poolt histooni H4 atsetüleerimine omakorda stimuleerib H3 atsetülatsiooni SAGA kompleksi poolt. (Ginsburg *et al.*, 2014)

Meie töögrupi poolt seni avaldamata andmed näitavad, et *yaf9* Δ pärmirakud on tundlikud histooni H4 aminohappejääkide mutatsioonidele. Kui mutantsete H4 histoonidega rakkudest eemaldada *anchor-away* (AA) ehk tsütoplasmasse sidumise meetodiga Yaf9, saab jälgida valgu eemaldamisega tekkivaid probleeme. Taolist meetodit kasutades on teada saadud, et H4K8,12R mutatsiooniga jäävad *yaf9* Δ pärmirakud rakutsükli G2 faasi seisma. Lisakatsetega on kindlaks tehtud, et H4K5,8,12R kolmikmodifikatsioon on *yaf9* Δ tüvele letaalne.



Joonis 6. H3K4 ja H3K36 metülatsioon reguleerib H3 ja H4 atsetülatsiooni ning deatsetülatsiooni transkriptsiooni elongatsiooni ajal. NuA4, mis atsetüleerib H4 saba, seostub Set1 poolt monometüleeritud H3K4-ga või Set2 poolt monometüleeritud H3K36-ga. SAGA kompleks, mis omakorda atsetüleerib histooni H3 saba, seondub nukleosoomidega, kus esineb H4 atsetüleeritud kujul. Modifitseeritud joonis allikast (Ginsburg *et al.*, 2014).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie töögrupi seni avaldamata andmetest on selgunud, et *yaf9Δ* pärmitüvedes on H4K12R mutatsioon kombinatsioonis H4K5R või H4K8R mutatsioonidega kasvu pärssiv ja H4K8,12R rakud jäävad seisma rakutsükli G2 faasi. H4K5,8,12R kolmikmutatsioon *yaf9Δ* tüvedes on letaalne.

Seni on teadmata, kas *yaf9Δ* rakud on tundlikud ka H3 histooni post-translatsiooniliselt modifitseeritavate aminohappejääkide mutatsioonidele. Sellest lähtuvalt seati töö eesmärgiks mainitud seost täpsemalt uurida. Käesoleva töö eesmärk on järgmine:

Uurida pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) *yaf9Δ* ja histooni H3 N-terminaalsete post-translatsiooniliselt modifitseeritavate aminohappejääkide mutatsioonide koosmõju pärmiraku kasvule. Praktilise töö käigus:

1. konstrueeriti *yaf9Δ* pärmitüved koos mutantsete H3 valkudega plasmidivahetussüsteemis ja jälgiti pärmirakkude kasvu;
2. konstrueeriti *yaf9Δ* ja H3 üksikmutantidega pärmitüved ning jälgiti pärmirakkude kasvu;
3. konstrueeriti *set1*, *set2* ja *dot1* metülltransferaaside ja *yaf9Δ* deletsioonidega tüved ning jälgiti pärmirakkude kasvu.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud pärmitüved

Kõigi töös kasutatud ja töö käigus valmistatud pärmitüvede genotüübid ja nende päritolu on täpsustatud lisa 1, tabelis 1.

Töös kasutatud pärmitüved on valmistatud tüve W303 baasil (Thomas ja Rothstein, 1989), millest omakorda tehti AKY202 plasmidivahetustüvi. AKY202 oli selles töös metsiktüüpi tüvi

yaf9 deletsiooniga AKY2000 suhtes. Histoone post-translatsiooniliste modifikatsioonide ja *yaf9* deletsiooni koosmõju hindamiseks transformeeriti muteeritud histoone kodeerivad plasmiidid *yaf9* deletsioonitüvesse ja Yaf9-t sisaldavasse kontrolltüvesse. Kokku saadi 7 uut pärmitüve, millega teostati töös kirjeldatud katseid.

Töö käigus valmistati *set1*, *set2* ja *dot2* deletsioonide ning *yaf9* deletsiooni koosmõju hindamiseks tüved AKY2491 (*yaf9Δdot1Δ*), AKY2493 (*yaf9Δset1Δ*), AKY2495 (*yaf9Δset2Δ*). Need saadi paljundades markergeene sisaldavalt plasmiididelt (Tabel 1) *URA3*, *HIS3* ja *NAT* markergeenid praimeritega (Lisa 2, Tabel 2), mis sisaldavad KMT-de Set1, Set2 ja Dot1 genoomsete lookustega komplementaarseid alasid. Saadud PCR-i produktid transformeeriti tüvesse AKY1820. Homoloogilise rekombinatsiooni teel asendati sihtmärkgeen PCR produktiga.

Lisaks valmistati edasiseks uurimiseks mainitud metüültransferaaside kaksikmutatsioonidega ja *yaf9* deletsiooniga tüved AKY2523 (*yaf9Δset2Δdot1Δ*, MAT α), AKY2525 (*yaf9Δset1Δdot1Δ*, MAT α), AKY2526 (*yaf9Δset1Δset2Δ*, MAT A) ja AKY2527 (*yaf9Δset1Δset2Δ*, MAT α). Tüved valmistati AKY2493 ristamisel AKY2519-ga (*set2Δ*), AKY2495 ristamisel AKY2515-ga (*dot1Δ*) ja AKY2493 ristamisel AKY2515-ga. AKY2515, AKY2517 (*set1Δ*) ja AKY2519-ga olid saadud tüvede suhtes metsiktüüpi, kuna neis ekspresseerus Yaf9 ja esinesid vaid metüültransferaaside deletsioonid.

2.2.2. Kasutatud plasmiidid

Kõik töös kasutatud plasmiidid on täpsustatud tabelis 1.

Katsetes kasutatud *S. cerevisiae* mutantseid histoone kodeerivad plasmiidid olid valmistatud *HIS3* markergeeniga pRS413 seeria plasmidi põhjal. Mutatsioonid on viidud histooni H3 aminohappejääkide post-translatsiooniliste modifikatsioonide positsioonidesse. *HIS3* markergeen võimaldab selekteerida histidiinita selektiivsöötme tassile külvates plasmidi omaks võtnud rakud.

Tabel 1. Kasutatud plasmiidid

Plasmiiidi nimi	Kasutamine
pRS413	Negatiivne kontroll H3 mitmikmutantide transformatsioonide osas
pRS413-H4-H3K9,14,18,23,27R	H3 mitmikmutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K9,14,18,23,27R ja H4
pRS413-H4-H3K4,36,79R	H3 mitmikmutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K4,36,79R ja H4
pRS413-H4-H3S10A	H3 mitmikmutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3S10A ja H4
pRS413-H4-H3	Positiivne kontroll H3 mitmikmutantide transformatsioonide osas
pRS413-H4-H3K18R	H3 mutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K18R ja H4
pRS413-H4-H3K23R	H3 mutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K23R ja H4
pRS413-H4-H3K27R	H3 mutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K27R ja H4
pRS413-H4-H3K9R	H3 mutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K9R ja H4
pRS413-H4-H3K56R	H3 mutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K56R ja H4
pRS413-H4-H3K14R	H3 mutantide valmistamiseks; kodeeritavad histoonid: H3K14R ja H4
pBS-3xF12-NAT	Metüültransferaasi <i>dot1</i> deletsioonitüve valmistamiseks
pBS-3x3F12-URA3	Metüültransferaasi <i>set2</i> deletsioonitüve valmistamiseks
pBS-3x3F12-HIS3	Metüültransferaasi <i>set1</i> deletsioonitüve valmistamiseks

2.2.3. Kasutatud söötmed

S.cerevisiae tüvesid kasvatati pärm-peptoon-dekstroosi (*yeast extract, peptone, glucose*; YPD) tard- ja vedelsöötmes. Tardsöötme koostis oli järgmine: agar 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l. Vedelsöötme koostis oli järgmine: pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l.

URA3 markergeeni puudumise kontrollimiseks kasvatati rakke 5-fluoro-oroothapet (5-FOA) sisaldaval selektiivsöötmel [5-FOA 1 mg/ml, YNB (*yeast nitrogen base*) 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 2%, lämmastikalused ja aminohapped – adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml].

Sporulatsiooniks kasvatati pärmirakke toitainevaesel sporulatsioonisöötmel [glükoos 0,5 g/l, pärmiekstrakt 1 g/l, kaaliumatsetaat 10 g/l, agar 20 g/l, lämmastikalused ja aminohapped –

adeniin 10 µg/ml, uratsiil 10 µg/ml, histidiin 10 µg/ml, trüptofaan 10 µg/ml, leutsiin 20 µg/ml, lüsiin 20 µg/ml].

Modifitseeritud tüvede jaoks kasvatati rakke selektiivsöötmetel, kust jäeti koostisest välja need aminohapped või lämmastikalused, mille põhjal tüvesid selekteeriti [agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml].

Modifitseeritud pärmitüvede seleksiooniks, kuhu transformeeriti markergeeniks NAT (*nourseothricin*), kasvatati rakke NAT antibiootikumi sisaldaval YPD tardsöötmetel (*nourseothricin* 100 µg/ml).

Lahjenduste rea analüüsiks kasutati sünteetilist täissöödet SC (*Synthetic complete medium*) [agar 20 g/l, YNB (*yeast nitrogen base*) 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml].

2.2.4. DNA eraldamine

Rakud võeti ühest kolooniast ja suspendeeriti 100 µl-s lüsilahuses (200 mM C₂H₃LiO₂, 1% SDS). Saadud suspensiooni inkubeeriti 5–15 minutit 70 °C juures, seejärel lisati 300 µl 96% etanooli, segati vorteksil ning asetati 5–10 minutiks -20 °C külmkappi. Saadud segu tsentrifuugiti 3 minutit 16,1 rcf-ga, supernatant eemaldati ja sadet pesti 70% etanooliga. Edasi võeti sade üles 70 µl vees ja tsentrifuugiti 1 minut uuesti 16,1 rcf-ga. Saadud genoomset DNA-d kontrolliti PCR-ga, kasutades selleks 1 µl supernatanti (Lõoke *et al.*, 2011).

2.2.5. PCR

Polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR meetodit (*polymerase chain reaction*) kasutati käesolevas töös pärmitüvede konstrueerimisel ning konstrueeritud tüvede õigsuse kontrollimisel. Kasutatud praimerid on toodud lisa 2, tabelis 2.

2.2.5.1. *yaf9Δset1Δ*, *yaf9Δset2Δ* ja *yaf9Δdot1Δ* deletsioonitüvede valmistamine

Deletsioonitüvede tegemiseks oli vaja esmalt valmistada PCR-ga DNA oligomeerid. Need pidid koosnema markergeenist (*HIS3*, *URA3* või *NAT*) ja omama 5' ja 3' otstes 50 aluspaari pikkust

komplementaarset ala sihtmärkgeeni (*SET1*, *SET2* või *DOT1*) ülesvoolu ning allavoolu genoomse regiooniga.

PCR reaktsioon viidi läbi 50 µl-s. Reaktsioonisegu sisaldas 5 µl 10x PCR puhvrit (*Phusion® HF Buffer*, *Thermo Scientific™*), 2 µl 5 mM nukleotiidide segu (ATP + GTP + CTP + TTP), 2,5 µl 10 mM praimereid (Lisa 2, Tabel 2), 0,5 µl DNA polümeraasi (*Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase*, *Thermo Scientific™*), 1 µl 20 ng/µl pBS-3x3F12-URA3, pBS-3x3F12-HIS5 või pBS-3xF12-NAT plasmidi ja 36,5 µl Milli-Q vett. PCRi programm oli järgmine:

Algne denaturatsioon: 98 °C 1 min

Denaturatsioon: 98 °C 10 s

Praimerite seondumine: 60 °C 20 s

Praimerite ekstensioon: 72 °C 45 s

} 30 tsükli

Lõpp-ekstensioon: 72 °C 5 min

2.2.5.2. Transformeeritud kolooniade kontroll PCR reaktsiooniga

Transformeeritud kolooniade kontrollimiseks kasutati praimereid, millest üks seondub genoomsele DNA-le deleteeritud geeni promootoralas (*DOT1_CTRL* – 5' TCCCTA ATGGTG TGGCATT TA 3', *SET1_CTRL* – 5' AATATC CGCTCG ACCAGT CC 3', *SET2_CTRL* – 5' ATATAT TTCCTG CCGTTG CTTC 3') ja teine plasmiidilt amplifitseeritud järjestusele, mis peaks olema genoomi integreerunud (Lisa 2, Tabel 2). Sellisel viisil tehti kindlaks, kas markergeen on sisenenud õigesse piirkonda. Eeldatav PCR produkti pikkus, mis viitab *DOT1* geeni deletsioonile oli 521 aluspaari, *SET2*-le 518 aluspaari ning *SET1*-le 523 aluspaari.

PCR reaktsioon viidi läbi 10 µl-s. Reaktsioonisegu sisaldas 2 µl 5x FIREPol® *MasterMix* (*Solis BioDyne*), 0,25 µl kumbagi 10 µM praimerit, 1 µl DNA-d (eraldatud DNA, kirjeldatud eespool) ja 6,5 µl Milli-Q vett. PCRi programm oli järgmine:

Algne denaturatsioon: 95 °C 10 min

Denaturatsioon: 95 °C 20 s

Praimerite seondumine: 54 °C 30 s

Praimerite ekstensioon: 72 °C 1 min

Lõpp-ekstensioon: 72 °C 5 min

} 30 tsükli

2.2.6. Agarosgeelelektroforees

Käesolevas töös läbiviidud PCR-i produktid visualiseeriti agarosgeelelektroforeesil etiidumbromiidi abil. Kasutati 1% agarosgeeli 1x TAE puhvris (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8) ja etiidumbromiidi (EtBr; 0,5 µg/ml). DNA konstrukti kontrollimise geelile pipeteeriti 5 µl DNA suurusmarkerit (50 ng/µl; *GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific*) ja 3 µl PCR-produkte. Kolooniade kontrolli puhul pipeteeriti geelile 5 µl DNA suurusmarkerit (50 ng/µl; *GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific*) ja kogu PCR-segu. Õigeteks osutunud kolooniatest valiti üks ja kasutati seda järgnevates katsetes.

2.2.7. Plasmiidivahetussüsteem

Plasmiidivahetussüsteemi eesmärk on lihtsustatult viia läbi metsiktüüpi valgu vahetamine mutantse vastu, kasutades vastavate valkude gene kandvaid plasmide. Pärmis tagab plasmiidivahetuse võimalus kasutada erinevaid auksotroofseid markergeene, eeskätt *URA3*. Selle poolt kodeeritav ensüüm muudab söötmesse lisatava kemikaali, 5-FOA, rakule mürgiseks aineks, mille tõttu rakud on sunnitud *URA3* markerit kandva plasmidi rakust elimineerima.

Meie kasutatud algtüvedes (AKY202 ja AKY2000) on eemaldatud genoomsed histoonigeenid ja rakkude eluspüsivuse tagamiseks viidud neisse metsiktüüpi histooni ekspresseeriv plasmid, mis kannab *URA3* markergeeni. Pämirakkude transformatsiooniga viidi käesolevas töös algtüvesse näiteks mutantset H3 geeni ja *HIS3* markergeeni ekspresseeriv plasmid ning pärast selektsiooni histidiiniga söötmel kasvatati rakke 5-FOA-d sisaldaval söötmel, mille tulemusena rakud vahetasid metsiktüüpi H3 valku kodeeriva plasmidi mutanti kodeeriva plasmidi vastu.

2.2.7.1. Pagaripärmi transformeerimine

Rakke kasvatati YPD vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30 °C, kuni nad saavutasid eksponentsiaalse kasvufaasi, mis on ligikaudu 3×10^7 rakku/ml tiheduse juures. Kompetentsete rakkude valmistamiseks tsentrifugeeriti 2 x 1,5 ml rakke 3 min 2,3 rcf juures, seejärel eemaldati põhja sadenenud rakkudelt sööde. Rakke suspendeeriti ning pesti 500 µl TE + 0,1 M C₂H₃LiO₂ lahusega ja tsentrifugeeriti uuesti 3 min 2,3 rcf juures. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 40 µl-s TE + 0,1 M C₂H₃LiO₂ lahuses. Transformatsioonisegu valmistamiseks lisati 50 µl-le

kompetentsete rakkude suspensioonile 7 µl eelnevalt denatureeritud (6 min, 95 °C) ja jääl jahutatud kandja-DNA-d, mis pärineb heeringast, ning 500 ng transformeeritavat plasmidi või deletsioonitüvede tegemiseks vajalikke DNA konstrukte. Segu hoiti 5 min toatemperatuuril ning lisati 300 µl 0,1 M C₂H₃LiO₂ + TE + 40 % polüetüleenglükooli (PEG 4000) lahust, segati vorteksil ning hoiti 15 min toatemperatuuril. Lisati 30 µl DMSO-d, segati vorteksil ja tehti kuumašokk 10 min 42 °C juures. Rakud tsentrifugeeriti 3 min 15,8 rcf juures, eemaldati supernatant, suspendeeriti 150 µl-s steriilses H₂O-s ja plaaditi selektiivsöötmele ning kasvatati 2–3 päeva temperatuuril 30 °C.

2.2.7.2. Transformeeritud plasmiidide ekspresseerumise kontroll

Katsetes kasutatud pärmitüvede genoomis on rikitud uratsiili biosünteesirada *ura3* mutatsiooniga. Et ekspresseeruksid geenivariandid lisatud plasmiididelt, kasvatati rakke 2–3 päeva 5-FOA-ga söötmel, mis sunnib rakke loobuma *URA3* geeni sisaldavast plasmiidist. Söötmes sisalduv 5-fluoro-oroothape (5-FOA) on substraadiks Ura3 valgule, mis konverteerib 5-FOA toksiliseks 5-fluoro-uratsiiliks.

2.2.8. Sporulatsioon ja tetraadide analüüs

Diploidse pärmitüve kasvatamisel toitainevaesel söötmel toimub rakkude sporulatsioon, mis tähendab meiotilist jagunemist ja nelja spoori tekkimist. Spooride nelik ehk tetraad sisaldab geneetiliselt erinevaid haploidseid rakke. Analüüsimaiks spooride genotüüpe, eraldati tetraadid mikroskoobi (*Singer Instruments MSM 400*) all, kandes individuaalsed spoorid laiali YPD söötmele. Pärast 2–3-päevast inkubatsiooni 30 °C juures, külvati rakud templikülvi abil selektiivsöötmetele, et kindlaks määrata saadud kolooniate genotüüpe.

2.2.9. 10-kordsete lahjendusterea analüüs

Võrdlemaks metsiktüüpi rakkude kasvu *yaf9Δ* ja mutantseid H3 histoone ekspresseerivate rakkudega, viidi läbi lahjenduste rea analüüs. Söötmetassilt steriilse hambaorgiga võetud uuritavad pärmitüved suspendeeriti 400 µl Milli-Q vees, segati *vortexil* ning segu tihedus mõõdeti spektrofotomeetriga (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*) 600 nm juures. Seejärel valmistati rida kümnekordseid lahjendusi nii, et kõige kontsentreeritum lahjendus

sisaldaks 10 000 raku/ μ l ja kõige lahjemas oleks 1 raku/ μ l. Valmistatud lahjendused kanti 5 μ l tilkadena agarsöötmele, inkubeeriti kaks kuni kolm päeva 30 °C juures. Viimaseks etapiks oli agartasside pildistamine (*EPSON Perfection™ 1200, Seiko Epson Corporation*).

2.3. Tulemused

2.3.1. *Yaf9* deletsiooni ja H3 mitmik-mutantide koosmõjul pidurdub pärmirakkude kasv

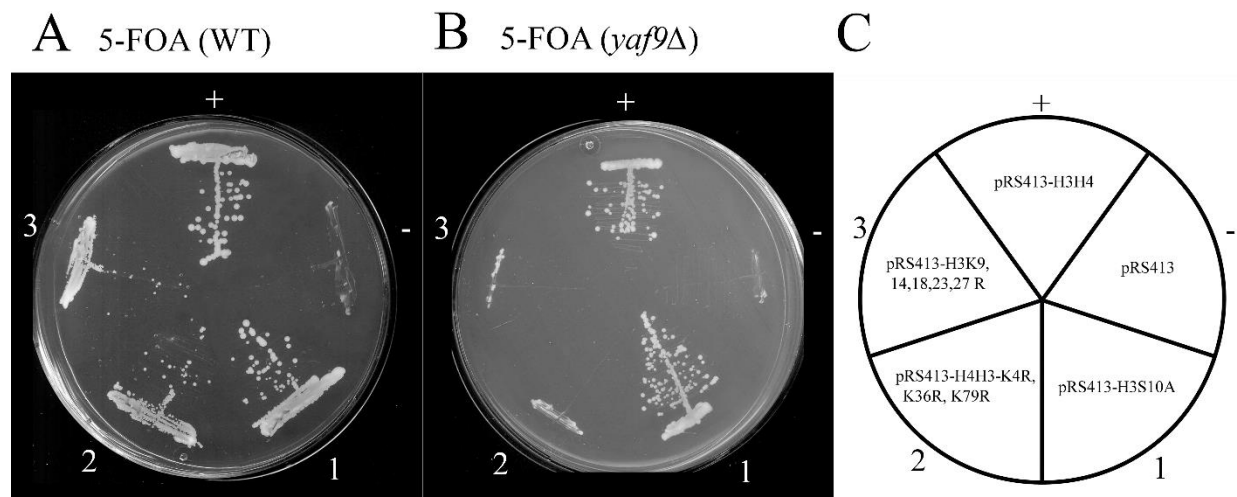
Hindamaks *yaf9* Δ ja histoonide post-translatsiooniliselt modifitseerivate aminohapete muteerimise koosmõju pärmirakkudele, kasutati plasmidi vahetussüsteemi meetodit. Esmalt aga tehti kindlaks H3 mutantide mõju pärmirakkude kasvule metsiktüüpi rakkudes kontrollkatse kaudu. *Yaf9* suhtes metsiktüüpi tüvesse (AKY202), kus ekspresseeriti mutatsioonideta histoonivalke *URA3* markerit kandvalt plasmiidilt, viidi eelnevalt meie töögrupi poolt valmistatud plasmiidid. Viimastes oli H3 histoonides lüsiin (K) asendatud arginiiniga (R) või seriin (S)alaniiniga (A). Histooni H3 atsetüleeritavate aminohappejääkide positsioonide K9, 14, 18, 23, 27 mutatsiooni uurimiseks kasutati plasmidi pRS413-H3K9,14,18,23,27R; metüleeritavate lüsiinjääkide K4, 36, 79 kolmikmutatsiooni uurimiseks plasmidi pRS413-H3-K4,36,79R ning fosforüleeritava aminohappejäägi seriin 10 uurimiseks plasmidi pRS413-H3S10A. Positiivseks kontrolliks transformeeriti rakkudesse ka metsiktüüpi H3 valku ekspresseeriv pRS413-H3H4 plasmiid. Negatiivseks kontrolliks kasutati tühja, histoonivalke mittekodeerivat, pRS413 vektorit. Pärast transformatsiooni külvati rakud histidiiniga selektiivtassidele.

Histidiiniga selektiivtassilt külvati rakud edasi 5-FOA tassile, et saada lahti metsiktüüpi histooni H3 ekspresseerivast *URA3* markeriga plasmiidist (Joonis 7). Kolmepäevase inkubeerimise järel 30 °C juures selgus, et rohkete H3 atsetüleeritavate ja metüleeritavate lüsiinjääkide modifikatsioonidega (H3K9,14,18,23,27R; H3K4,36,79R) rakkude kasv oli võrreldes metsiktüüpi histooni ekspresseerivate rakkudega aeglustunud ning vaevalisem. H3 fosforüleeritava seriini asendusalaniiniga ei mõjutanud rakkude kasvu (Joonis 7A, C).

Kasutades eelnevalt kirjeldatud katseskeemi viidi samasugune eksperiment läbi ka *yaf9* deletsiooniga rakkudes (AKY2000), et uurida *yaf9* Δ tüves histooni H3 mutantide mõju pärmirakkude kasvule. Katset korrati kaks korda ja saadud tulemused ühtisid mõlemal korral.

Tüves AKY2000 oli silmnähtav erisugusus positiivse kontrolli ja tüvede vahel, kus olid histooni H3 N-terminaalsete sabade lüsiinide jäägid asendatud arginiiniga. Kasv polnud tuvastatav rakkudes, kus olid modifikatsioonid positsioonidel H3K4,36,79 ja asukohtadel H3K9,14,23,27 (Joonis 7B, C). Samas fosforüleerimisega seotud aminohappejäägi muteerimine histoonil H3 ei avaldanud pärmirakkude kasvule mõju.

Kontrolltüve AKY202 ning *yaf9* deletsiooniga AKY2000 samade plasmiididega transformatsiooni läbinud H3K9,14,23,27R ja H3K4,35,79R mutatsioonidega rakkude vahel olid 5-FOA söötmel märgatavad kasvuerinevused. Sellest saab järeldada, et histooni H3 lüsiinjääkide mitmikmutatsioonidega pärmitüved kasvavad vaevaliselt normaaltingimustes, kuid valk Yaf9 on vajalik nende ellu jäämiseks. Nagu näidatud varasemates töödeski, pole Yaf9 hädavajalik pärmis ellujäämiseks, kuna nii metsiktüüpi kui ka *yaf9Δ* pärmitüvedes on kasv normaalne, kui histoonivalgul puuduvad lisamutatsioonid.



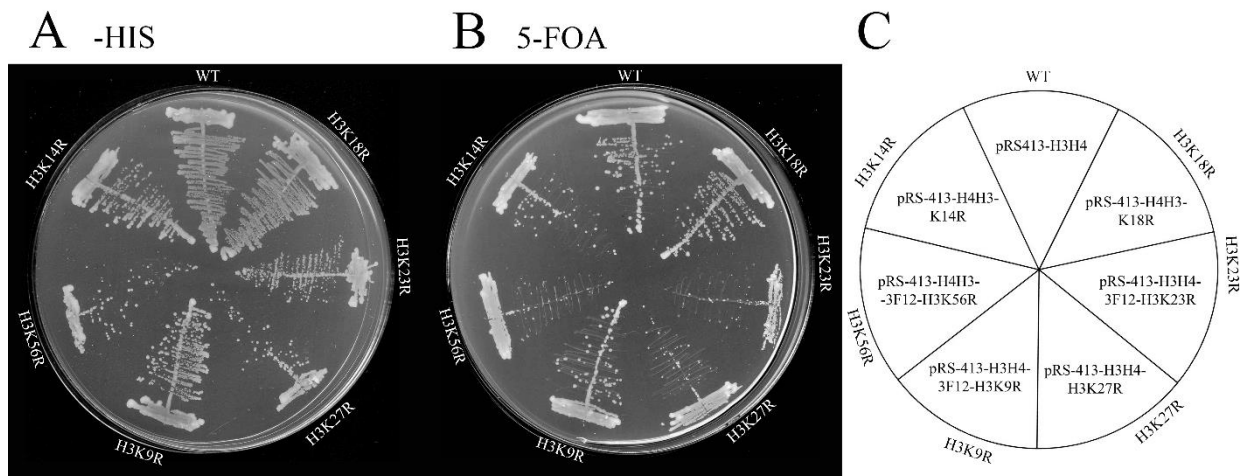
Joonis 7. Mutantset H3 ekspresseerivad metsiktüüpi ja *yaf9* deletsiooniga pärmitüved 5-FOA söötmel. WT (A; AKY202) ja *yaf9Δ* (B; AKY2000) plasmiidivahetustüvesid transformeeriti H3 metsiktüüpi või mutantseid variante ekspresseerivate plasmiididega vastavalt skeemile (C). Rakke inkubeeriti 30°C juures 3 päeva. WT - positiivne kontroll; "-" - negatiivne kontroll.

2.3.2. *Yaf9* deletsiooni ja H3K23R, H3K27R või H3K56R modifikatsioonide koosmõju pidurdab pärmiraku kasvu

Kuna eelnev katse näitas, et H3 atsetüleeritavate aminohappejääkide mitmikmutatsioon on *yaf9Δ* tüves letaalne, sooviti teada saada, kas H3 mutatsioonide mõju on kumulatiivne, või on letaalne mõju mõnel üksikul H3 aminohappejäägi mutatsioonil. Lisaks seni uuritud positsioonidele

kaasati katsesse ka positsioon H3K56, kuna kirjanduse põhjal võib Yaf9-l olla spetsiifiline roll selle PTMi äratundmisel (Schulze *et al.*, 2010).

Edasiseks uurimiseks korrati transformatsiooniprotsessi *yaf9* Δ pärmirakkudega (AKY2000). Rakkudesse transformeeriti *URA3*-ga metsiktüüpi histoon ekspresseriiv plasmidi asemele plasmiidid, millel H3 histoonis olevaid atsetüleerimisega seotud aminohappepositsioone oli üksikult modifitseeritud. Positiivseks kontrolliks transformeeriti rakkudesse taas pRS413-H3H4 plasmiid. Pärast transformatsiooni külvati rakud histidiinita selektiivtassidele ja sealt edasi 5-FOA tassile (Joonis 8A, B). Saadud rakud säilitati ka töö käigus valminud tüvedena, mis on leitavad lisast 1, tabelist 1.



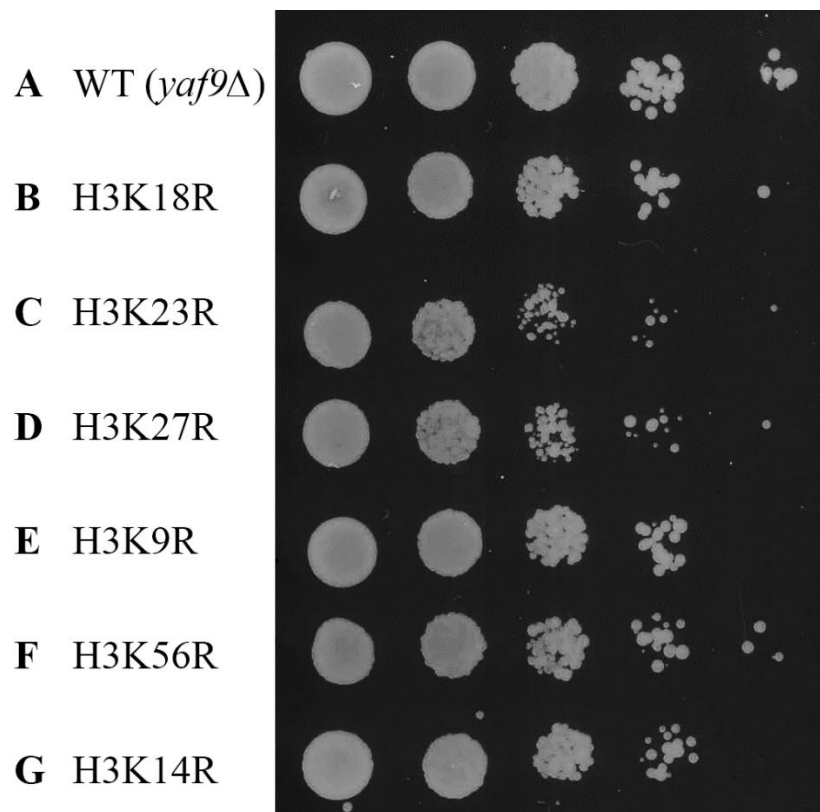
Joonis 8. Mutantset H3 histooni ekspresseerivad *yaf9* deletsiooniga pärmitüved -HIS ja 5-FOA söötmetel. *yaf9* Δ plasmidivahetustüve (AKY2000) transformeeriti H3 metsiktüüpi või mutantseid variante ekspresseerivate plasmiididega vastavalt skeemile (C). Transformatsiooni läbinud rakud külvati -HIS söötmele (A) ning pärast kolmepäevast inkubeerimist 30 °C juures 5-FOA söötmele (B). “WT” - positiivne kontroll.

Pärast kolme päeva 30 °C juures inkubeerimist märgati -HIS tassil, et pärmirakud, kuhu viidi plasmiidid, milles olid lüsiinijäägid asendatud arginiiniga asukohtadel H3K27 (AKY2482) ja H3K56 (AKY2484), kasvasid aeglasemini metsiktüüpi H3-e ekspresseerivate AKY2000 rakkudest.

Paaripäevase inkubeerimise järel oli 5-FOA tassilt märgata võrdluses metsiktüüpi H3-e ekspresseerivate AKY2000 rakkudega, et pärmirakkudes, kuhu viidi plasmiidid, milles histooni H3 atsetüleeritav lüsiinijääk oli asendatud arginiiniga positsioonidel 23 (AKY2481), 27 (AKY2482) ja 56 (AKY2484), oli kasv pidurdunud. Märgatav oli ka aeglasem kasv rakkudes,

kus H3 lüsiini jääk asendati arginiiniga positsioonil 9 (AKY2483) ja 14 (AKY2485), kuid mitte lüsiini asendusel arginiiniga positsioonil 18 (AKY2480).

Kuna seni kasutatud pärmirakkude lahjenduskülvilt pole näha väiksemaid kõikumisi rakkude kasvukiiruses ning et vältida külvamiseks võetud pärmirakkude hulga kõikumisi, tehti samasid mutatsioone kandvatest rakkudest ka täppkülviga lahjendusread -HIS tassile (Joonis 9). Nähti, et tüved, kus olid mutatsioonid positsioonidel H3K23R (AKY2481) ja H3K27R (AKY2482), kasvavad võrreldes metsiktüüpi AKY2479-ga kõige aeglasemalt. Kuigi lahjenduskülvidel oli H3K56R mutatsiooniga rakkude kasv pidurdunud (Joonis 8B), siis lahjendusrealt samasugust tulemust ei märganud. Samuti ei esine kasvuraskusi tüvedel, kus on mutatsioonid asukohtadel H3K18R (AKY2480), H3K9R (AKY2483) ja H3K14R (AKY2485).



Joonis 9. *yaf9Δ* ja H3 histooni mutantseid vorme ekspresseerivate pärmitüvede 10-kordsete vahedega lahjenduskülv -HIS söötmel. Esimesel real olevad WT (*wildtype*) metsiktüüpi histoonid ekspresseerivad *yaf9Δ* rakud (AKY2479) on positiivseks kontrolliks järgnevatele tüvedele.

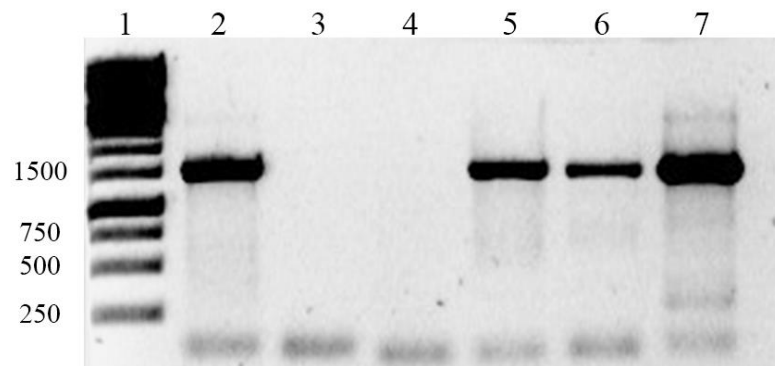
2.3.3. *yaf9Δ* ja histooni H3 metülatsioonimutantide koosmõju uurimine

Eelnevate katsete tulemused näitasid (Joonis 7B), et *yaf9Δ* tüves oli histooni H3 kolme metüleeritava positsiooni mutatsiooni koosmõju letaalne. Sellest tulenevalt otsustati uurida, kas mõnel üksikul H3 metüleeritaval lüsiinjäägi mutatsioonil on sarnane efekt.

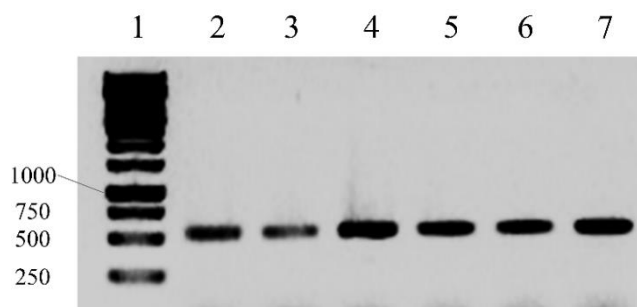
2.3.3.1. *yaf9Δset1Δ*, *yaf9Δset2Δ* ja *yaf9Δdot1Δ* deletsioonitüvede valmistamine

Erinevalt atsetültransferaasidest, on pärmi metüültransferaasid äärmiselt spetsiifilised histoonide aminohappejääkide suhtes. Set1 metüleerib H3 lüsiini positsioonil 4, Set2 vastutab H3K36 ja Dot1 H3K79 metüleerimise eest. Seega hindamaks *yaf9* deletsiooni ja H3K4R, H3K36R ja H3K79R koosmõju, valmistati *yaf9Δ* ja neid positsioone metüleerivate metüültransferaaside deletsioonidega pärimtüved. Need saadi kui tüvesse (AKY1820) viidi PCR-ga valmistatud DNA oligomeerid, mis koosnesid markergeenist (*HIS3*, *URA3* või *NAT*) ja omasid komplementaarset *ala* sihtmärkgeeni (*SET1*, *SET2* või *DOT1*) ülesvoolu ning allavoolu genoomse regiooniga. Saadi järgmised DNA konstruktid: *SET1*-5'-*HIS3*-*SET1*-3' (1378 ap), *SET2*-5'-*URA3*-*SET2*-3' (1516 ap), *DOT1*-5'-*NAT*-*DOT1*-3' (1665 ap). Homoloogilise rekombinatsiooni meetodiga asendus sihtmärkgeen genoomis markergeeniga (*SET1::HIS3*, *SET2::URA3*, *DOT1::NAT*).

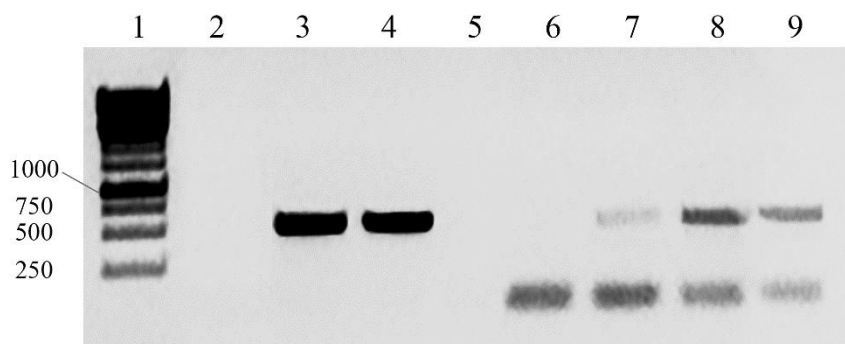
PCR produkte kontrolliti enne transformatsiooni agarosgeelelektroforeesil, iga PCR-i reaktsioon viidi läbi kahes korduses (Joonis 10). *SET1*-5'-*HIS3*-*SET1*-3' ning *SET2*-5'-*URA3*-*SET2*-3' amplifitseerimine õnnestus vaid ühel puhul (Joonis 10, rada 2 ja 5), kuid saadi kätte kõigi



Joonis 10. Transformatsiooniks kasutatavate geenikonstruktidite paljundamine PCR meetodil. Rajal 1 on DNA suurusmarker (1 kb GeneRuler DNA ladder). Radadel 2 ja 3 on PCR-meetodiga kontrollitud *SET1*-5'-*HIS3*-*SET1*-3' (1378 ap), radadel 4 ja 5 *SET2*-5'-*URA3*-*SET2*-3' (1516 ap) ning radadel 6 ja 7 *DOT1*-5'-*NAT*-*DOT1*-3' (1665 ap) geenikonstrukte. Kasutatud on 1%-list agarosgeeli ning DNA visualiseerimiseks UV valguses on kasutatud EtBr-i.



Joonis 11. *yaf9Δdot1Δ* kolooniade kontroll agarosgeelelektroforeesil. Rajal 1 on DNA suurusmarker (*GeneRuler 1 kb DNA ladder*). Radadel 2–7 on PCR-meetodiga kontrollitud *DOT1* geeni deletsiooni. Deletsioone kinnitavad 521 aluspaari pikkused fragmendid. Kasutatud on 1%-list agarosgeeli ning DNA visualiseerimiseks UV valguses on kasutatud EtBr-i.



Joonis 12. *yaf9Δset1Δ* ja *yaf9Δset2Δ* kolooniade kontroll. Rajal 1 on DNA suurusmarker (*GeneRuler 1 kb DNA ladder*). Radadel 2–5 on PCR-meetodiga kontrollitud *SET2* geeni deletsiooni. Radadel 6–9 on kontrollitud *SET1* geeni deletsiooni. Deletsioone kinnitavad vastavalt 518 ja 523 aluspaari pikkused fragmendid. Kasutatud on 1%-list agarosgeeli ning DNA visualiseerimiseks UV valguses EtBr-i.

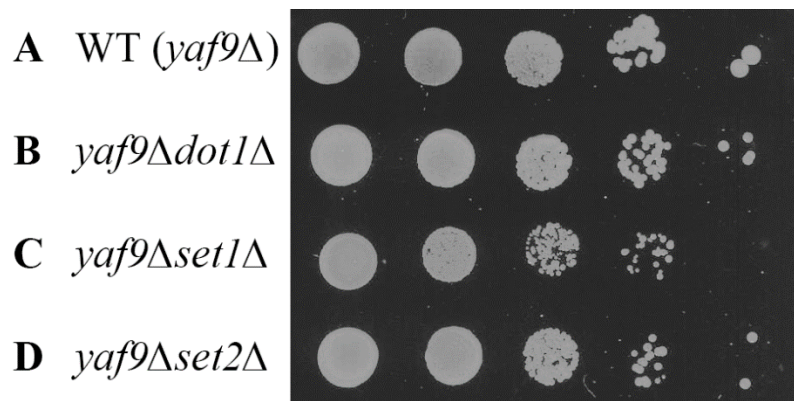
deletsioonide tegemiseks vajalikud DNA konstruktid, mida kasutati edasisteks katseteks.

Pärmi KMT-de deleteerimiseks genoomsest DNA-st transformeeriti valmistatud PCR produktid liitumatsetaadi meetodiga rakkudesse. Rakud külvati vastavatele selektiivtassidele (-HIS, -URA või +NAT), kus vaid transformatsiooni edukalt läbinud kolooniad suutsid kasvada. Üles kasvanud *yaf9Δdot1Δ* kolooniatest valiti seitse, *yaf9Δset1Δ* ja *yaf9Δset2Δ* kolooniatest mõlemast 4, millest eraldati DNA ning kontrolliti PCR-ga, kas transformeeritud DNA konstruktid integreerusid õigesti asukohtadesse (Joonised 11 ja 12). *Yaf9Δdot1Δ* kolooniatest andsid kõik positiivse signaali (umbes 500 ap pikkune fragment), kuid *yaf9Δset1Δ* kolooniatest vaid kolm

(Joonis 12, rada 7, 8 ja 9) ning *yaf9Δset2Δ* kolooniatest kaks (Joonis 12, rada 3 ja 4). Püskikultuurid valmistati *yaf9Δdot1Δ* koloonia nr 2-st (AKY2491), *yaf9Δset1Δ* koloonia nr 8-st (AKY2493) ja *yaf9Δset2Δ* koloonia nr 1-st (AKY2495).

2.3.3.2. Metüültransferaasi *SET1* deletsioon *yaf9Δ* tüves aeglustab pärmiraku kasvu

Valmistatud tüvede (AKY2491, AKY2493, AKY2495) kasvu hindamiseks, võrreldes *yaf9* deletsiooniga tüve AKY1820-ga, tehti 10-kordsed lahjendusread täppkülvil meetodil SC + AA tassile (Joonis 13). Leiti, et *SET1* deletsioon *yaf9Δ* tüves aeglustab pärmirakkude kasvu, kuid *yaf9Δdot1Δ* ning *yaf9Δset2Δ* tüved kasvavad *yaf9* deletsioonitüvega samaväärselt.



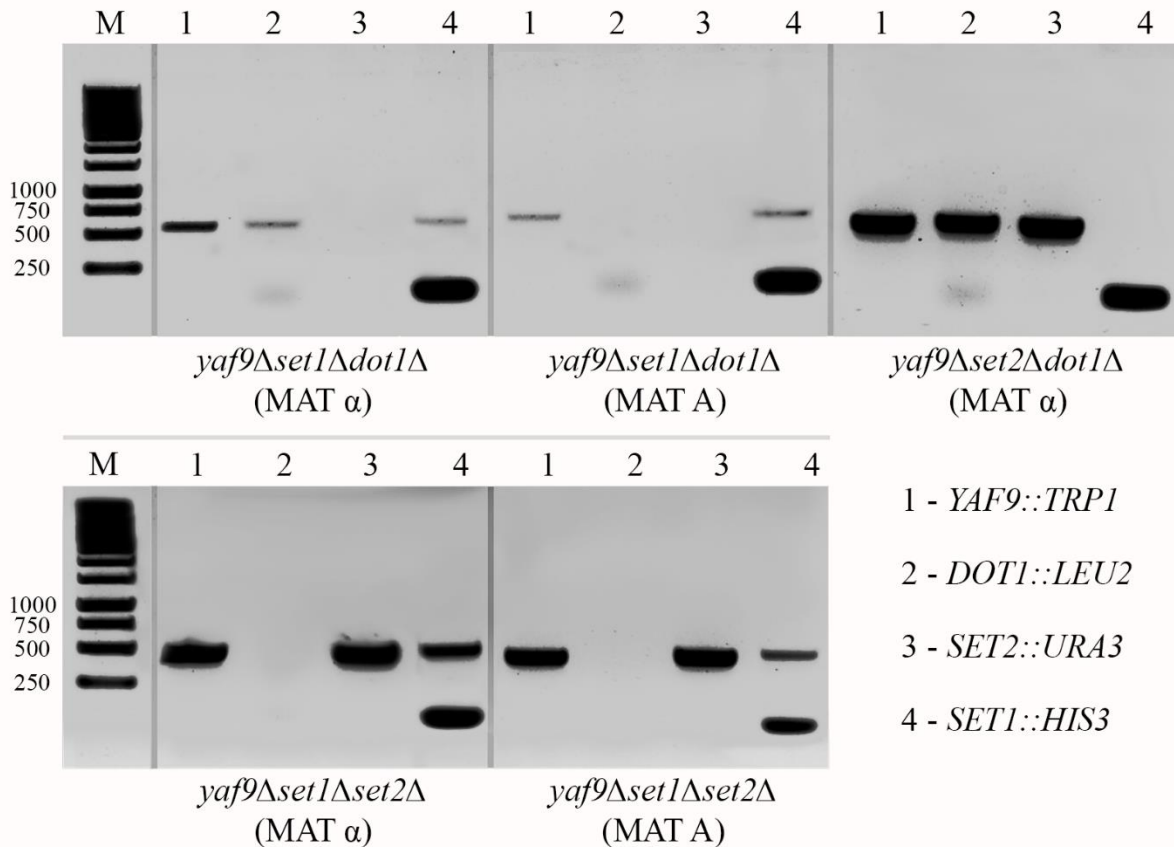
Joonis 13. Metüültransferaaside *set1*, *set2*, *dot1* deletsioonide ja *yaf9Δ* tüvede 10-kordsete vahedega lahjenduskülv SC+AA söötmel. WT tüveks on AKY1820 (*yaf9Δ*), *yaf9Δdot1Δ* deletsioonidega tüvi on AKY2491, *yaf9Δset2Δ* deletsioonidega AKY2493, *yaf9Δset2Δ* deletsioonitüvi on AKY2495.

2.3.3.3. Metüültransferaaside *dot1*, *set1* ja *set2* mitmikdeletsioonide ning *yaf9* deletsiooniga tüvede valmistamine

Kuna eelmisest katsest nähti, et *yaf9Δdot1Δ* ja *yaf9Δset2Δ* fenotüüp sarnanes *yaf9Δ* tüvele AKY1820, siis otsustati uurida, kas rohkem kui ühe metüültransferaasi puudumine H3-I mõjutab rakkude kasvu *yaf9Δ* rakkudes. Lisaks sooviti teada saada, kas *SET1* deletsioon *yaf9Δ* tüves, kombinatsioonis teiste metüültransferaaside deletsioonidega, raskendab veelgi pärmirakkude kasvu. Selleks konstrueeriti pärmitüved, kus erinevad KMT-de mutatsioonid esinevad koos *yaf9* deletsiooniga tüves.

Uued tüved saadi ristates erinevaid geenideletsioone kandvaid pärmitüvesid: AKY2493 (*yaf9Δset1Δ*) ristati AKY2519-ga (*set2Δ*), AKY2495 (*yaf9Δset2Δ*) AKY2515-ga (*dot1Δ*) ja

AKY2493 (*yaf9Δset1Δ*) AKY2515-ga (*dot1Δ*). Saadud ristamised tembeldati selektiivtassidele, kus vaid kolmikmutandid suutsid kasvada (*SET1::HIS3*, *SET2::URA3*, *DOT1::LEU2*, *YAF9::TRP1*). Selektiivtassidelt tehti lahjenduskülv toitainevaesele sporulatsioonisöötmele. Sporuleerumisel formeeruvad individuaalsetest rakkudest meiotilisel teel neli spoori. Pärast 4-päevast 30 °C juures inkubeerimist eraldati sporulatsioonitassil moodustunud tetraadid mikroskoobi (Singer Instruments MSM 400) all, kandes individuaalsed spoorid laiali YPD söötmele. YPD söötmelt tembeldati spoorid uuesti selektiivtassidele, määramaks millistes spoorides esinevad eelnevalt mainitud deletsioonid. Saadi viis uut tüve: AKY2523 (*yaf9Δset2Δdot1Δ*, MAT α), AKY2524 (*yaf9Δset1Δdot1Δ*, MAT A), AKY2525 (*yaf9Δset1Δdot1Δ*, MAT α), AKY2526 (*yaf9Δset1Δset2Δ*, MAT A), AKY2527



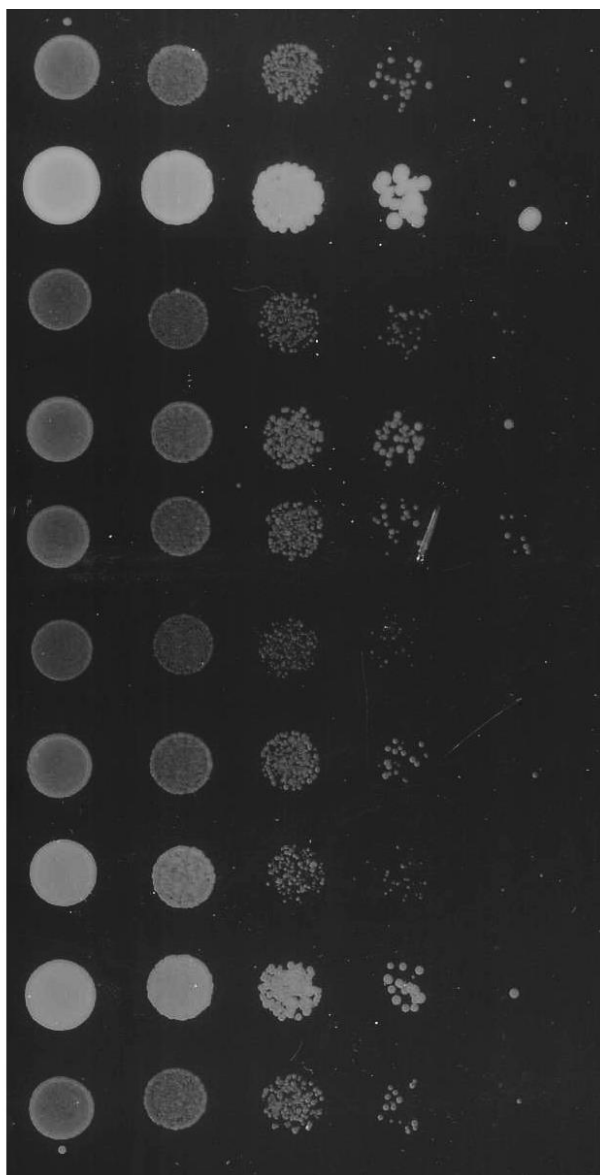
Joonis 14. Tüvede *yaf9Δset2Δdot1Δ* (AKY2523, MAT α), *yaf9Δset1Δdot1Δ* (AKY2524, MAT A), *yaf9Δset1Δdot1Δ* (AKY2525, MAT α), *yaf9Δset1Δset2Δ* (AKY2526, MAT A), *yaf9Δset1Δset2Δ* (AKY2527, MAT α). Rajal M on DNA suurusmarker (*GeneRuler 1 kb DNA ladder*). Rajal 1 on PCR-meetodiga kontrollitud *YAF9* geeni, rajal 2 *DOT1* geeni, rajal 3 *SET2* geeni ja rajal 4 *SET1* geeni deletsiooni. Deletsioone kinnitavad umbes 520 aluspaari pikkused fragmendid. Kasutatud on 1%-list agarosgeeli ning DNA visualiseerimiseks UV valguses on kasutatud EtBr-i.

(*yaf9Δset1Δset2Δ*, MAT α). Neid kontrolliti selektiivtassidel tehtud selektsioonidele lisaks PCR reaktsiooniga, milleks esmalt eraldati DNA ning siis kontrolliti PCR-ga, kas esinevad sihtmärkgeenide deletsioonidele vastatavad markergeenide fragmendid. Produktid visualiseeriti agarosgeelelektroforeesil EtBr-ga (Joonis 14). Geelil kontrolliti iga tüve puhul negatiivse kontrollina ka sellise markergeeni esinemist, mis ei tohiks signaali anda. Tüved AKY2523 (*yaf9Δset2Δdot1Δ*), AKY2525 (*yaf9Δset1Δdot1Δ*), AKY2526 (*yaf9Δset1Δset2Δ*) ja AKY2527 (*yaf9Δset1Δset2Δ*) andsid oodatud PCR-i signaali (umbes 500 ap). Leiti, et kuigi tüvi AKY2524 kasvas selektiivtassil, ei esinenud tal *DOT1* deletsioonile viitavat fragmenti.

2.3.3.4. Metüültransferaaside ja *yaf9* deletsiooni koosmõju võrdluses üksikdeletsioonidega metsiktüüpi tüvedega

Kõikide metüültransferaaside deletsioonide ja *yaf9Δ* deletsiooniga tüvede kasvu hindamiseks võrreldes tüvedega *yaf9Δ*(AKY1820), *dot1Δ* (AKY2515), *set1Δ* (AKY2517) ja *set2Δ* (AKY2519), tehti 10-kordsed lahjendusread täppkülvil meetodil SC + AA tassile (Joonis 15). Kontrolltüvena kasutatud *set1Δ* tüvi (Joonis 15C) kasvab aeglasemini võrreldes *yaf9Δ* tüvega, mille fenotüüp sarnaneb teadaolevalt metsiktüüpi tüvele. *DOT1* deletsiooniga tüvi (AKY2515) kasvas ootamatult hoogsalt ning seega vajaks tulevikus lisakontrolle genotüübi osas. Kuna *dot1Δ* tüve kasutati KMT mitmikmutantide tegemisel, jäeti analüüsist välja samuti ebaloomulikku kasvu näidanud *yaf9Δset2Δdot1Δ* ja *yaf9Δset1Δdot1Δ* (Joonis 15 – H, I). Kinnitust leidsid ka eelnevast katsest saadud tulemused, et *yaf9Δset1Δ* tüvel esineb kasvuraskusi võrreldes *yaf9Δ* tüvega, kuid *yaf9Δset2Δ* ja *yaf9Δdot1Δ* tüved kasvavad *yaf9Δ* tüvele võrdväärse kiirusega (Joonis 15 – E, F, G). KMT-de mitmikdeletsioon *set1Δset2Δ* kombinatsioonis *yaf9* deletsiooniga ei avaldanud rakkude kasvukiirusele märgatavat mõju (Joonis 15J).

- A *yaf9* Δ
- B *dot1* Δ
- C *set1* Δ
- D *set2* Δ
- E *yaf9* Δ *dot1* Δ
- F *yaf9* Δ *set1* Δ
- G *yaf9* Δ *set2* Δ
- H *yaf9* Δ *set2* Δ *dot1* Δ
- I *yaf9* Δ *set1* Δ *dot1* Δ
- J *yaf9* Δ *set1* Δ *set2* Δ



Joonis 15. Metüültransferaaside mitmik- ja üksikdeletsioonide ning *yaf9* deletsiooniga tüvede 10-kordsete vahedega lahjenduskülv SC+AA söötmel. Võrdlustüvedeks on *yaf9* Δ (AKY1820), *dot1* Δ (AKY2515), *set1* Δ (AKY2517) ja *set2* Δ (AKY2519) tüved KMT-de üksik- ja mitmikdeletsioonidega ja *yaf9* deletsiooniga tüvede suhtes.

2.4. Arutelu

Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid mõjutavad kõiki DNA-ga seotud protsesse kromatiini struktuuri muutmise kaudu ning on seondumiskohaks mittehistonsetele valkkompleksidele. Käesoleva uurimistöo keskmes oli pärmis leiduv YEATS-domeeni omav valk Yaf9. YEATS-domeeni kaudu suudab valk seonduda histoonide atsetüleeritud ning krotonüleeritud lüsiinijääkidega. Yaf9 on ka NuA4 kompleksi ning SWR1-C kompleksi subühik. Meie töögrupi seni avaldamata andmetest on selgunud, et kombineerituna histooni H4 lüsiinide 5, 8 ja 12 mutatsioonidega, on Yaf9 puudumine rakkudele letaalne. Sellest lähtuvalt otsustati uurida ka histooni H3 mutantide ning Yaf9 koosmõju.

Antud töös saadud tulemused näitasid, et pärmirakud vajavad normaalseks kasvuks kas valku Yaf9 või H3-e atsetüleerimist, kuna *yaf9* deletsiooni ja mutantsete H3 histoonidega tüvedel esines kasvuraskusi võrreldes metsiktüüpi tüvega (Joonis 8) ning H3 mitmikmutatsioonid *yaf9Δ* tüves olid letaalsed (Joonis 7B). Leiti, et *yaf9* deletsiooniga pärmirakkudes, kuhu viidi plasmiidid, milles histooni H3 lüsiinijääk asendati arginiiniga positsioonidel 23, 27 või 56, oli kasv pidurdunud. Saadud tulemus korreleerub teadaoleva seosega Yaf9 ja H3K27 atsetülatsiooni vahel: valk seondub mainitud atsetüleeritud aminohappejäägiga (Shanle *et al.*, 2015). Kleini ja kolleegide uurimistöo tulemustest tuleb välja, et Yaf9 seondumine atsetüleeritud H3K27-ga on vajalik H2A-H2B dimeeride asendamiseks H2A.Z-H2B dimeeridega *PHO5* promootori juures (Klein *et al.*, 2018). Varasemad uuringud toetavad ka käesoleva töö ühes katses täheldatud kasvudefektide *yaf9Δ* tüvedel, kus H3K56 on mitteatsetüleeritavas vormis (Schulze *et al.*, 2010). H3 positsiooni 56 atsetülatsioon on oluline transkriptsioonil ning DNA parandamisel. Asf1 ning Yaf9 YEATS-domeeni sarnasuse põhjal võib oletada, et H3K56 atsetüleerimisel omab Yaf9 Asf1-ga samalaadset rolli ehk hõlbustab tuua K56 atsetüültranseraasi Rtt109–Vps75 kromatiinile. Samas vajaks mainitud atsetülatsioonikoha mutatsioon *yaf9Δ* tüves edasist uurimist, kuna käesolevas uurimistöös teises katses ei olnud H3 lüsiinijäägi 56 arginiiniga asendamisel *yaf9Δ* rakkudes märgata kasvuraskusi (Joonis 9F). Histooni H3K23 muteerimise efekti põhjuse üle *yaf9Δ* rakkude kasvule on raskem arutleda, kuna pärmis ei ole veel leitud ülesannet, mis hõlmaks H3K23 atsetüleerimist.

Lisaks märgati katsete käigus metsiktüüpi tüvega võrreldes aeglasemat kasvu *yaf9Δ* rakkudes, kus H3 lüsiinijääk asendati arginiiniga positsioonil 9 või 14. Võib spekuloida, et Yaf9 puudumisel H3K14R rakkudel esineb metsiktüüpi tüvega võrreldes aeglasem kasv, kuna

H3K56ac on seotud H3K14 atsetüleerimisega. H3 lüsiinijäägi 14 atsetüleerimine aitab kromatiinile tuua SWI/SNF kompleksi, mis tagab juurdepääsu Asf1-le, võimaldades seega Rtt109–Vps75-l H3K56 atsetüleerida (Cote *et al.*, 2019). Kuigi on leitud, et Yaf9 homoloogi AF9 YEATS-domeen seondub tugevasti H3K9 atsetülatsiooniga (Li *et al.*, 2014), siis valguga Yaf9 pole taolist eelistust täheldatud. Antud töös selgus katsete põhjal, et *yaf9* deletsiooniga tüved pole mõjutatud H3K18 atsetülatsioonist. Sarnane paralleel väljendub taas Yaf9 homoloogi AF9 kohta Li ja kolleegide uurimistööst (Li *et al.*, 2014).

Kuna kolmikmutatsioon H3 metüleeritavatel aminohappejääkidel oli *yaf9* Δ tüves letaalse mõjuga, viidi läbi katsed üksikute H3 metüleeritavate lüsiinijääkide mutatsioonide ja *yaf9* deletsiooni koosmõju uurimiseks. Tänu sellele, et metüültransferaasid on kõrge spetsiifikaga, sai H3 metüleeritavate positsioonide uurimiseks valmistada *yaf9* Δ tüved, kust on deleteeritud Set1, Set2 või Dot1. Set1 vastutab histooni H3 lüsiini 4, Set2 H3K36-e ja Dot1 H3K79-e metüleerimise eest. Meie töögrupi avaldamata andmetest tuleb välja, et metüültransferaasi *set5*, mis metüleerib lüsiinijäägid asukohtadel H4K5, H4K8 ja H4K12, deletsioon ei mõjuta *yaf9* deletsiooniga kombinatsioonis pärmirakkude kasvu. See teadmine toetab kaudselt käesoleva töö tulemusi, kust leiti, et *set1*, *set2* või *dot1* deletsioonid ei avalda olulist mõju *yaf9* Δ rakkudele. Kuna YEATS-domeeni puhul pole täheldatud seondumist metüleeritud histoonidele, siis võib oletada, et tänu sellele ei ole KMT-de üksikmutantidel Yaf9 puudumise korral rakkude kasvule drastilist mõju. Uuriti ka erinevate H3 lüsiinijääke metüleerivate KMT-de mitmikdeletsioone *yaf9* Δ tüves, kuid samuti ei avastatud suuri kasvudefekte. Katsete käigus märgati, et *dot1* deletsiooniga tüvi kasvab ebatavaliselt hästi võrreldes *yaf9* Δ tüvega, kuigi on teada, et mõlemad tüved peaks omama metsiktüüpi fenotüüpi. Seega tuleks katseid korrata KMT-de mitmikdeletsioonidega tüvedega, kus nende valmistamiseks oli kasutatud ka mainitud *dot1* Δ (AKY2515) tüve. Uued *yaf9* Δ *set2* Δ *dot1* Δ ja *yaf9* Δ *set1* Δ *dot1* Δ tüved tasuks valmistada transformatsiooni teel. Samaaegselt tuleks kontrollida *dot1* Δ (AKY2515) tüve genotüüpi, et olla kindel, mis põhjustas valmistatud tüvede ebatavalise kasvu. Samuti tasub tulevikus läbi viia lisakatseid, et teada saada, miks on kõigi kolme KMT deletsioon *yaf9* tüves letaalne. Eeldatavasti on H3 lüsiinijääkide korruga metüleerimine oluline samas protsessis, kus eri metülatsioonikohad võivad võtta üle teineteise funktsioone.

Meie töögrupi avaldamata tulemused näitavad, et H4K8,12R *yaf9* Δ rakud jäävad seisma rakutsükli G2 faasi. Üheks tulevikuperspektiiviks oleks uurida, kas samalaadne mõju avaldub ka *yaf9* deletsiooniga rakkudes, kus esinevad mutatsioonid asukohtadel H3K23, H3K27 ja H356.

Siiski on veel teadmata täpsed põhjused, miks H3K23R ja H3K27R mutatsioonid pidurdavad *yaf9* Δ rakkude kasvu või miks H4K5,8,12R ning H3 metülatsiooni ja atsetülatsiooniga seotud lüsiinide mitmikmutatsioonid *yaf9* Δ rakkudele on letaalsed. H3 mitmete lüsiinijääkide korraga atsetüleerimine või metüleerimine võib vastutada mõne kompleksi kohaletoomise eest kromatiinile, kus ka Yaf9-l esineb teatud abistav roll, sest kui üks kahest faktorist eemaldada, on see rakkudele surmav. Kuna histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonide vahel esineb tihtipeale vastastikune regulatsioon, tasuks vaadata H3K23 ja H3K27 mitmikmutatsioonide koosmõju *yaf9* Δ rakkudes.

KOKKUVÕTE

Eukariootsete rakkude tuumas on DNA seoses valkudega, moodustunud struktuuri nimetatakse kromatiiniks. Selle põhiliseks struktuurseks üksuseks on nukleosoom, mis moodustub kui DNA keerdub ümber kaheksa histoonivalgu (kahes korduses H2A, H2B, H3 ja H4). Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid mõjutavad kromatiini avatust ning selle kaudu DNA-ga seotud protsesse. Lisaks on PTM-d seondumiskohaks mittehistoonsetele valkkompleksidele. Pärnis oleval valgul Yaf9 esineb YEATS-domeen, mille kaudu on valk suuteline seonduma histoonide atsetüleeritud ning krotonüleeritud lüsiinjääkidega.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida histooni H3 post-translatsiooniliste modifikatsioonide koosmõju *yaf9* deletsiooniga *S. cerevisiae* rakkude kasvule.

Selgus, et H3K4,36,79R ja H3K9, 14, 23, 27R (Joonis 7B) mutatsioonid on *yaf9Δ* tüves letaalsed. Samas H3 fosforüleeritava seriinjäägi 10 muteerimine ei avaldanud *yaf9Δ* rakkudele nähtavat mõju. Uurides H3 atsetüleeritavate lüsiinjääkide üksikuid mutatsioone *yaf9* deletsiooniga tüves, leiti et H3K23R ja H3K27R mutatsioonid põhjustasid suuri kasvuraskusi, kuid mitte mutatsioonipositsioonil H3K18 (Joonis 8B). Histooni H3 metülatsioonikohtade ja Yaf9 koosmõju uurimiseks valmistati esmalt üksikute metüültransferaaside ja *yaf9* deletsioonidega tüved. Leiti, et *yaf9Δ* tüvega AKY1820 võrdluses ei esine neil suuri kasvudefekte. Edasiseks uuriti KMT-de mitmikdeletsioone *yaf9* deletsiooniga kombineeritult ning samuti ei leitud märgatavaid kasvuerinevusi. Kuna aga avastati, et KMT-de mitmikdeletsioonidega tüvede valmistamiseks kasutatud *dot1* deletsioonitüvel esines üllatavalt jõuline kasv, siis tasuks tulevikus valmistada uued *yaf9Δset2Δdot1Δ* ja *yaf9Δset1Δdot1Δ* tüved ja analüüsida teistkordselt nende kasvu *yaf9Δ* tüvega võrdluses.

Käesoleva töö tulemuste põhjal on võimalik jätkata uuringuid, mis tooksid selgust, millise mehhanismi kaudu tekitab H3 erinevate lüsiinjääkide modifitseerimine *yaf9Δ* tüvele kasvuraskusi.

The effect of combining histone H3 mutants and *yaf9* deletion on the growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Mari Ann Rebane

SUMMARY

The protection and preservation of genetic information is very important for any living organism. The DNA of eukaryotes is located within the cell nucleus, where it is packed into a structure called chromatin. The main structural unit of the formed complex is the nucleosome. The latter is formed when the double-stranded DNA of about 150 base pairs is twisted 1,7 times around eight alkaline histone proteins (H2A, H2B, H3 and H4 in two repetitions). Chromatin is a very dynamic structure that can be modified for example through the electrochemical effects caused by post-translational modifications (PTMs) of histones. PTMs thereby affect all processes related to DNA and can also serve as a binding site for non-histone protein complexes. Yaf9, a subunit of the NuA4 (*nucleosomal acetyltransferase of H4*) complex and SWR1-C (*SWI2/SNF2-Related 1 Chromatin Remodeling Complex*), is one of the three proteins in baker's yeast (*S. cerevisiae*) that has a YEATS-domain, with what it is able to bind to acylated lysine residues of histones. It is found that Yaf9 is not essential in the yeast cell, but its deletion makes the cells more sensitive to DNA-damaging substances and hypersensitive to microtubule depolymerizing agents.

Previously unpublished data from our work-group has shown that in *yaf9*Δ yeast strains, the H4K12R mutation, in combination with either H4K5R or H4K8R mutations, inhibits cell growth, and H4K8,12R cells remain stuck in the G2 phase of the cell cycle. H4K5,8,12R triple-mutation in *yaf9*Δ strains is lethal. It is still unknown whether *yaf9*Δ cells are also sensitive to mutations in the post-translationally modifiable amino acid residues of H3 histone. Accordingly, the aim of this work explores the relationship between Yaf9 and PTMs of histone H3 using both plasmid exchange system and methyltransferase deletion strains.

The results showed that mutations in H3K4,36,79R and H3K9, 14, 23, 27R (Figure 7B) are lethal in the *yaf9*Δ strain. However, the mutation of H3 Ser10 to the arginine had no visible effect on *yaf9*Δ cells. By studying individual mutations of H3 acetylated lysine residues in the *yaf9*Δ deletion strain, it was found that H3K23R, H3K27R and H3K56R mutations caused great growth difficulties. However, the H3K56 mutation in the *yaf9*Δ strain would require further study, as in another experiment of this research paper, no growth difficulties were noticeable. Slower growth

was observed in comparison to the wildtype *yaf9* Δ strain in *yaf9* Δ cells, where the H3 lysine residue was replaced by arginine at a position of 9 or 14, but the mutation of H3K18 in *yaf9* deletion strain caused no growth defect.

Because the H3 triple-mutation of methylated amino acid residues had a lethal effect in the *yaf9* Δ strain, experiments were conducted to study the interaction of H3 methylated lysine residue single mutations and *yaf9* deletion. Due to the high specificity of yeast methyltransferases, it was possible to study the H3 methylated lysine residues by preparing *yaf9* Δ strains from which Set1, Set2 or Dot1 were deleted. Set1 methylates the lysine residue 4 of histone H3, Set2 H3K36 and Dot1 H3K79. It is found from the unpublished data of our work-group that the deletion of methyltransferase Set5, which methylates lysine residues at H4K5, H4K8 and H4K12, does not affect the growth of yeast cells in combination with *yaf9* deletion. This knowledge indirectly supports the results of this work, which found that *set1*, *set2* or *dot1* deletions do not have a significant effect on *yaf9* Δ cells. Multiple deletions of different H3 KMTs in the *yaf9* Δ strain were also studied, but no major growth peculiarities were detected either. During the experiments, it was observed that the *dot1* deletion strain, used to make multi-deletion strains of KMTs, grows unusually well compared to the *yaf9* Δ strain, although both mentioned strains should have a similar wildtype like phenotype. Therefore, it would be wise preparing new *yaf9* Δ *set2* Δ *dot1* Δ and *yaf9* Δ *set1* Δ *dot1* Δ strains in the future and analysing their growth for a second time in comparison with the *yaf9* Δ strain. Furthermore, additional tests should be conducted to find out why the deletion of all three KMTs in the *yaf9* Δ strain is lethal. It can be speculated if the methylation of all H3 lysine residues is important in the same process, with different methylation sites taking over each other's functions.

The unpublished results of our work-group show that the *yaf9* Δ cells with H4K8,12R mutation remain stuck in the G2 phase of the cell cycle. One future perspective would be to examine whether a similar effect occurs in *yaf9* Δ cells with H3K23R, H3K27R or H3K56R mutations. However, the exact reasons why H3K23R and H3K27R mutations inhibit *yaf9* Δ cell growth or why multiple mutations of H3 lysines associated with methylation and acetylation are lethal to *yaf9* Δ cells are still unknown. Since there is often shared regulation between post-translational modifications of histones, it is worth looking at the interaction between H3K23 and H3K27 multi-mutations and *yaf9* deletion in cells.

KIRJANDUSE LOETELU

Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L., ja Côté, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *The EMBO Journal*, 18(18), 5108–5119. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.5108>

Allfrey, V. G., Faulkner, R., ja Mirsky, A. E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(5), 786–794.

Barnes, C. E., English, D. M., ja Cowley, S. M. (2019). Acetylation ja Co: An expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays in Biochemistry*, 63(1), 97–107. <https://doi.org/10.1042/EBC20180061>

Bird, A. W., Yu, D. Y., Pray-Grant, M. G., Qiu, Q., Harmon, K. E., Megee, P. C., Grant, P. A., Smith, M. M., ja Christman, M. F. (2002). Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*, 419(6905), 411–415. <https://doi.org/10.1038/nature01035>

Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y. R., Winston, F., ja Allis, C. D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*, 15(24), 3286–3295. <https://doi.org/10.1101/gad.940201>

Burgess, R. J., Zhou, H., Han, J., ja Zhang, Z. (2010). A Role for Gcn5 in Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Molecular Cell*, 37(4), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.020>

Burks, A. W., Holgate, S. T., O’Hehir, R. E., Broide, D. H., Bacharier, L. B., Hershey, G. K. K., Peebles, R. S., ja Middleton, E. (2020). *Middleton’s allergy: Principles and practice*. <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20161002419>

Cheung, A. C. M., ja Díaz-Santín, L. M. (2019). Share and share alike: The role of Tra1 from the SAGA and NuA4 coactivator complexes. *Transcription*, 10(1), 37–43. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1530936>

Chromatin structure and epigenetics—ScienceDirect. (s.a.). Salvestatud 11. aprill 2022, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295206003637>

Cote, J. M., Kuo, Y.-M., Henry, R. A., Scherman, H., Krzizike, D. D., ja Andrews, A. J. (2019). Two factor authentication: Asf1 mediates crosstalk between H3 K14 and K56 acetylation. *Nucleic Acids Research*, 47(14), 7380–7391. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz508>

Cutter, A. R., ja Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *3D Genome structure.*, 589(20, Part A), 2914–2922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>

de la Cruz, X., Lois, S., Sánchez-Molina, S., ja Martínez-Balbás, M. A. (2005). Do protein motifs read the histone code? *BioEssays*, 27(2), 164–175. <https://doi.org/10.1002/bies.20176>

Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., ja Côté, J. (2004). Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5), 1884–1896. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.5.1884-1896.2004>

Espinosa-Cores, L., Bouza-Morcillo, L., Barrero-Gil, J., Jiménez-Suárez, V., Lázaro, A., Piqueras, R., Jarillo, J. A., ja Piñeiro, M. (2020). Insights Into the Function of the NuA4 Complex in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00125>

Flaus, A., Martin, D. M. A., Barton, G. J., ja Owen-Hughes, T. (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Research*, 34(10), 2887–2905. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl295>

Gerhold, C. B., ja Gasser, S. M. (2014). INO80 and SWR complexes: Relating structure to function in chromatin remodeling. *Trends in Cell Biology*, 24(11), 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.06.004>

Gaiimo, B. D., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S. B., ja Borggreffe, T. (2019). The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics and Chromatin*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0274-9>

- Gillette, T. G., ja Hill, J. A. (2015). Readers, writers and erasers: Chromatin as the Whiteboard of Heart Disease. *Circulation research*, 116(7), 1245–1253. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303630>
- Ginsburg, D. S., Anlembom, T. E., Wang, J., Patel, S. R., Li, B., ja Hinnebusch, A. G. (2014). NuA4 Links Methylation of Histone H3 Lysines 4 and 36 to Acetylation of Histones H4 and H3. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32656–32670. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585588>
- Green, E. M., Mas, G., Young, N. L., Garcia, B. A., ja Gozani, O. (2012). Methylation of H4 lysines 5, 8 and 12 by yeast Set5 calibrates chromatin stress responses. *Nature structural and molecular biology*, 19(3), 361–363. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2252>
- Gujral, P., Mahajan, V., Lissaman, A. C., ja Ponnampalam, A. P. (2020). Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00637-5>
- Klein, B. J., Ahmad, S., Vann, K. R., Andrews, F. H., Mayo, Z. A., Bourriquen, G., Bridgers, J. B., Zhang, J., Strahl, B. D., Côté, J., ja Kutateladze, T. G. (2018). Yaf9 subunit of the NuA4 and SWR1 complexes targets histone H3K27ac through its YEATS domain. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 421–430. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1151>
- Krebs, J. E. (2007). Moving marks: Dynamic histone modifications in yeast. *Molecular BioSystems*, 3(9), 590–597. <https://doi.org/10.1039/B703923A>
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C. D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M. T., ja Berger, S. L. (2006). Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes and Development*, 20(18), 2580–2592. <https://doi.org/10.1101/gad.1457006>
- Lachner, M., O’Sullivan, R., ja Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of cell science*, 116, 2117–2124. <https://doi.org/10.1242/jcs.00493>
- Le Masson, I., Yu, D. Y., Jensen, K., Chevalier, A., Courbeyrette, R., Boulard, Y., Mitchell Smith, M., ja Mann, C. (2003). Yaf9, a Novel NuA4 Histone Acetyltransferase Subunit, Is

- Required for the Cellular Response to Spindle Stress in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), 6086–6102. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6086-6102.2003>
- Lee, K. K., ja Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: One size doesn't fit all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 284–295. <https://doi.org/10.1038/nrm2145>
- Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S. Y. R., Li, W., Li, H., ja Shi, X. (2014). AF9 YEATS Domain Links Histone Acetylation to DOT1L-Mediated H3K79 Methylation. *Cell*, 159(3), 558–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.049>
- Lorch, Y., ja Kornberg, R. D. (2015). Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 48(4), 465–470. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000116>
- Lu, P. Y. T., Lévesque, N., ja Kobor, M. S. (2009). NuA4 and SWR1-C: Two chromatin-modifying complexes with overlapping functions and components This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 30th Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(5), 799–815. <https://doi.org/10.1139/O09-062>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., ja Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., ja Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), 325–328. <https://doi.org/10.2144/000113672>
- Maeshima, K., ja Eltsov, M. (2008). Packaging the Genome: The Structure of Mitotic Chromosomes. *Journal of Biochemistry*, 143(2), 145–153. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm214>
- Mccullough, S. D., ja Dolinoy, D. (2018). *Toxicoepigenetics: Core Principles and Applications*. Academic Press.
- Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., ja Smith, M. M. (1998). Cse4p Is a Component of the Core Centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 94(5), 607–613. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81602-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81602-5)

- Nowak, S. J., ja Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*, 20(4), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.02.007>
- Pek, J. W., Anand, A., ja Kai, T. (2012). Tudor domain proteins in development. *Development*, 139(13), 2255–2266. <https://doi.org/10.1242/dev.073304>
- Peterson, C. L., ja Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14(14), R546–R551. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
- Piatti, P., Zeilner, A., ja Lusser, A. (2011). ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factors and Their Roles in Affecting Nucleosome Fiber Composition. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6544–6565. <https://doi.org/10.3390/ijms12106544>
- Quina, A. S., Buschbeck, M., ja Di Croce, L. (2006). Chromatin structure and epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1563–1569. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.016>
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., ja Kobor, M. S. (2009). YEATS domain proteins: A diverse family with many links to chromatin modification and transcription This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB's 51st Annual Meeting – Epigenetics and Chromatin Dynamics, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 65–75. <https://doi.org/10.1139/O08-111>
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., ja Kobor, M. S. (2010). Reading chromatin. *Epigenetics*, 5(7), 573–577. <https://doi.org/10.4161/epi.5.7.12856>
- Separovich, R. J., ja Wilkins, M. R. (2021). Ready, SET, Go: Post-translational regulation of the histone lysine methylation network in budding yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(2), 100939. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100939>
- Shanle, E. K., Andrews, F. H., Meriesh, H., McDaniel, S. L., Dronamraju, R., DiFiore, J. V., Jha, D., Wozniak, G. G., Bridgers, J. B., Kerschner, J. L., Krajewski, K., Martín, G. M., Morrison, A. J., Kutateladze, T. G., ja Strahl, B. D. (2015). Association of Taf14 with acetylated histone H3 directs gene transcription and the DNA damage response. *Genes and Development*, 29(17), 1795–1800. <https://doi.org/10.1101/gad.269977.115>

- Shi, J., Ma, Y., Hua, H., Liu, Y., Li, W., Yu, H., ja Liu, C. (2021). Dynamic Histone H3 Modifications Regulate Meiosis Initiation via Respiration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.646214>
- Smolle, M., ja Workman, J. (2012). Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et biophysica acta*, 1829. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.008>
- Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J., ja Cairns, B. R. (2004). The Yaf9 Component of the SWR1 and NuA4 Complexes Is Required for Proper Gene Expression, Histone H4 Acetylation, and Htz1 Replacement near Telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9424–9436. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9424-9436.2004>
- Zhao, D., Li, Y., Xiong, X., Chen, Z., ja Li, H. (2017). YEATS Domain—A Histone Acylation Reader in Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, 429(13), 1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.010>
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., ja Zhao, Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), 1016–1028. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>
- Taverna, S. D., Ilin, S., Rogers, R. S., Tanny, J. C., Lavender, H., Li, H., Baker, L., Boyle, J., Blair, L. P., Chait, B. T., Patel, D. J., Aitchison, J. D., Tackett, A. J., ja Allis, C. D. (2006). Yng1 PHD Finger Binding to H3 Trimethylated at K4 Promotes NuA3 HAT Activity at K14 of H3 and Transcription at a Subset of Targeted ORFs. *Molecular Cell*, 24(5), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.026>
- Tu, S., Bulloch, E. M. M., Yang, L., Ren, C., Huang, W.-C., Hsu, P.-H., Chen, C.-H., Liao, C.-L., Yu, H.-M., Lo, W.-S., Freitas, M. A., ja Tsai, M.-D. (2007). Identification of Histone Demethylases in *Saccharomyces cerevisiae**. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14262–14271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609900200>
- Wang, A. Y., Schulze, J. M., Skordalakes, E., Gin, J. W., Berger, J. M., Rine, J., ja Kobor, M. S. (2009). Asf1-like structure of the conserved Yaf9 YEATS domain and role in H2A.Z deposition and acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21573–21578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906539106>

Wong, W. (2022). Shifting acetylation during starvation. *Science Signaling*, 15(717), eabo1065.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.abo1065>

LISAD

Lisa 1.

Järgnevas tabelis (Tabel 1) on toodud töös kasutatud pärmitüvede genotüübid ja päritolu.

Tabel 1. Kasutatud pärmitüvede genotüübid ja päritolu

Tüvenumber	Genotüüp	Päritolu
W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100R lys2D</i>	(Thomas ja Rothstein, 1989)
AKY202	W303, MAT A, <i>hht2-hhf2::LEU2</i> , [YCp50:HHT2-HHF2 (<i>URA3</i>)], <i>hht1-hhf1::KanMX</i>	Jesper Svejstrup (David Stillman)
AKY1820	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Kadri Peil
AKY2000	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [YCp50:HHT2-HHF2 (<i>URA3</i>)], <i>yaf9Δ::HIS3</i>	Kadri Peil
AKY2479	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS412-H3H4 (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2480	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS-413-H3H4-3F12-H3K18R (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2481	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS-413- pRS-413-H3H4-3F12-H3K23R (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2482	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS-413-H3H4-3F12-H3K27R (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2483	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS-413-H3H4-3F12-H3K9R (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2484	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS-413-H3H4-3F12-H3K56R (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2485	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::KanMX</i> , [pRS-413-H3H4-3F12-H3K14R (<i>HIS3</i>)], <i>yaf9Δ::TRP1</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2491	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>dot1Δ::NAT</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2493	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set1Δ::HIS3</i>	Töö tulemusena valminud

AKY2495	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set2Δ::URA3</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2515	W303, MATA, <i>dot1Δ::LEU2</i>	Kersti Kristjuhan
AKY2517	W303, MATA, <i>set1Δ::HIS3</i>	Kersti Kristjuhan
AKY2519	W303, MATA, <i>set2Δ::URA3</i>	Kersti Kristjuhan
AKY2523	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set2Δ::URA3</i> , <i>dot1Δ::LEU2</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2524	W303, MAT A, <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set1Δ::HIS3</i> , <i>dot1Δ::LEU2</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2525	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set1Δ::HIS3</i> , <i>dot1Δ::LEU2</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2526	W303, MAT A, <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set2Δ::URA3</i> , <i>set1Δ::HIS3</i>	Töö tulemusena valminud
AKY2527	W303, MAT α , <i>yaf9Δ::TRP1</i> , <i>set2Δ::URA3</i> , <i>set1Δ::HIS3</i>	Töö tulemusena valminud

Lisa 2.

Järgnevas tabelis (Tabel 2) on välja toodud kõik töös kasutatud praimerite järjestused.

Tabel 2. Kasutatud praimerite loetelu

Nimi	Järjestus	Kasutamine
DOT1-KO-5'	5' TCGCCTT TGGTTA CATTTC GTTGTA CAGTAA TGGGCG GTCAA GAAAG TATGAT AGCTCA TTTTGG AGTTCG 3'	Deletsioonitüvede valmistamine
DOT1-KO-3'	5' TCATCT GGTATA CTTAC CGGCGT ACCTCT GTTCCT CCTACC TCTTGC AGCAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'	Deletsioonitüvede valmistamine
SET2-KO-5'	5' ATGTCG AAGAAC CAAAGT GTGAGT GCGTCGG AAGATG AAAAAG AAATAC TGATAG CTCATT TTGGAG TTCG 3'	Deletsioonitüvede valmistamine
SET2-KO-3'	5' TTATGA TGATGT TGAAGG TGGAGG AGAAGA CATCCT TGTTGA TGCTGA TGCAGG AAACAG CTATGAC CATG 3'	Deletsioonitüvede valmistamine
SET1-KO-5'	5' ATGTCA AATTAC TATAGA AGAGCA CACGCG TCTTCTG GTTCAT ACAGAC AGATAG CTCATT TTGGAG TTCG 3'	Deletsioonitüvede valmistamine
SET1-KO-3'	5' TCAGTT CAAGAA ACCTTT ACAATT AGGTGC TCCACA TAAACA AGGAAG TCCAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'	Deletsioonitüvede valmistamine
FBA1_ctrl_2	5' CGAACTCCAAAATGAGCTATC 3'	Deletsioonide kontrollimine
DOT1_CTRL	5' TCCCTAATGGTGTGGCATTTA 3'	Deletsioonide kontrollimine
SET1_CTRL	5' AATATCCGCTCGACCAGTCC 3'	Deletsioonide kontrollimine
SET2_CTRL	5' ATATATTTCTGCCGTTGCTTC 3'	Deletsioonide kontrollimine

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin südamest tänada oma juhendajat, Signe Värvi, kannatlikuse, positiivsuse ja väga hea juhendamise eest. Samuti tänan ka tervet Rakubioloogia õppetooli meeldiva seltskonna ning abivalmiduse eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mari Ann Rebane,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Yaf9 ja histooni H3 post-translatsiooniliste modifikatsioonide koosmõju olulisus pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)“, mille juhendaja on Signe Värvi, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mari Ann Rebane

26.05.2022