

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Transkriptsioonifaktorite *forkhead 1* (Fkh1) ja *forkhead 2* (Fkh2) roll vaigistamisel

***Saccharomyces cerevisiae* rakkudes**

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia

12 EAP

Merilin Rääk

Juhendaja *PhD* Signe Värv

TARTU 2021

INFOLEHT

Transkriptsioonifaktorite *forkhead 1* (Fkh1) ja *forkhead 2* (Fkh2) roll geenide vaigistamisel *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes

Käesolevas töös uuriti transkriptsioonifaktorite *forkhead 1* (Fkh1) ja *forkhead 2* (Fkh2) deletsiooni mõju kolmele vaigistuspiirkonnale pagaripärmis: rDNA, telomeersed alad ja paardumistüüpi määravad lookused (HMR/L). Kasutati *triple silencer* tüve (TRS), milles vaigistatavatesse piirkondadesse on viidud markergeenid, mille vaigistamist saab detekteerida. Käesolev uuring näitas, et Fkh1 on oluline HMR lookuse vaigistamisel, kuid rDNA vaigistamisele mõjub pigem pärssivalt. Fkh2 ei mõjuta kummagi piirkonna (rDNA, HMR) vaigistamist. Fkh1 ja Fkh2 ei mõjutanud ka telomeeride vaigistamist.

Märksõnad: kromatiin, geenide vaigistamine, paardumistüüpi määravad lookused (HMR/L), ribosomaalne DNA, telomeerid, *forkhead 1*, *forkhead 2*, kolmikmarker, *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

The role of transcription factors Fkh1 and Fkh2 in gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae*

The aim of this study was to analyse the effect of transcription factors forkhead 1 (Fkh1) and forkhead 2 (Fkh2) deletion on gene silencing in three distinctive silencing regions: rDNA, telomeres and HMR locus. For that purpose, *triple silencer* (TRS) strain was used, where marker genes were incorporated to regions where silencing occurred. Current studies showed that Fkh1 is important in HMR silencing, its importance in rDNA silencing however was rather weak. Fkh2 didn't have any impact on silencing in rDNA and HMR loci. Fkh1 and Fkh2 weren't important in telomeric silencing.

Keywords: chromatin, gene silencing, hidden MAT left (HML), hidden MAT right (HMR), ribosomal DNA, telomeres, forkhead 1, forkhead 2, triple silencer, *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Geeniekspressiooni regulatsioon	8
1.2 Kromatiin	9
1.2.1 Histoonid	10
1.2.1.1 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid	11
1.3 Vaigistatavad piirkonnad pärmis	13
1.3.1 Paardumistüübi lookused (HMR/L)	13
1.3.2 Telomeerid	16
1.3.3 rDNA	17
1.4 Forkhead valkude perekond - Fkh1 ja Fkh2	19
1.5 Mudelorganism <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1 Töö eesmärk	21
2.2 Materjalid ja meetodika	21
2.2.1 Kasutatud tüved ja plasmiidid	21
2.2.1.1 Triple silencer meetod	23
2.2.2 Kasutatud söötmed	24
2.2.3 Deletsioonikasseti paljundamine PCR meetodil	24
2.2.4 Pagaripärmi transformatsioon LiOAc meetodil	26
2.2.5 Transformatsioonil saadud pärmikolooniate õigsuse kontrollimine PCR-i abil	27
2.2.6 Agaroosgeelelektroforees	28
2.2.7 <i>S.cerevisiae</i> rakkude kasvu hindamine lahjendusrea meetodil	28
2.3 Tulemused	29
2.3.1 Fkh2 deletsiooniga pärmitüve konstrueerimine	29
2.3.1.1 KanMX geeni genoomi rekombineerumise kontroll	30
2.3.2 Lahjenduste rea analüüs	31
2.3.2.1 Fkh1 valk pärsib rDNA vaigistamist.	31
2.3.2.2 Fkh1 valk soodustab HMR lookuse vaigistamist	32

2.3.2.3 Fkh1 ja Fkh2 valgud ei mõjuta telomeeri vaigistamist.	34
2.4 Arutelu	35
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	39
KIRJANDUSE LOETELU	40
LISAD	45
Lisa 1	45
Lisa 2	48
TÄNUAVALDUSED	49

KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – 5-*Fluoroorotic acid*

ADE – **adeniin**

Asf1- *anti-silencing function protein 1* (mittevaigistava funktsiooniga valk 1)

CAN- *L-Canavanine* (L- kanavaniin)

Cdc14- *Cell Division Cycle* (raku jagunemise tsükkel)

CLB2- Cyclin B (tsükliin B)

DBD- *DNA-binding domain* (DNA-d siduv domeen)

E-sait- *Essential for silencing* (vaigistamiseks essentsiaalne)

FHA- *Forkhead-Associated domain* (forkheadi siduv domeen)

FHAD - *forkhead-associated domain* (forkheadiga siduv domeen)

Fkh1 – *Forkhead Homologue One* (Forkhead homoloog 1)

Fkh2- *Forkhead Homologue Two* (Forkhead homoloog 2)

Fob1 - *FOrk Blocking protein* (replikatsioonikahvli peataja valk)

H1 – histoon H1

H2A – histoon H2A

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H4 – histoon H4

HFD- **histone fold domain** (histooni voltuimise domeen)

HIS – **histidiin**

HML – *hidden MAT left* (peidetud MAT vasakul)

HMR – *hidden MAT right* (peidetud MAT paremal)

HP1- heterokromatiini proteiin

I-sait- *Important for silencing* (vaigistamiseks vajalik)

LEU – **leutsiin**

MAT- *mating type* (paardumistüüp)

Net1- *Nucleolar silencing Establishing factor and Telophase regulator* (tuuma vaigistamise faktor ja telofaasi regulaator)

NTS1 - *nontranscribed spacer 1* (mittekodeeritav vaheala 1)

NTS2 - *nontranscribed spacer 2* (mittekodeeritav vaheala 2)

ORC- *Origin recognition complex* (*origin*'it äratundev kompleks)

PTM- **post-translational modification** (translatsioonijärgne modifikatsioonid)

Rap1- *Repressor/Activator site binding protein* (Repressori/Aktivaatori seondumisvalk)

rDNA- *ribosomal DNA* (ribosomaalne DNA)

RENT - *regulator of nucleolar silencing and telophase exit* (vaigistamise regulatsioon ja telofaasi väljapääs)

RFB - *replication fork block* (replikatsioonikahvli peataja)

Sir1/2/3/4 - *Silent information regulator one, two, three, four* (Vaigistuse regulaator 1, 2, 3, 4)

TEL- **Telomere** (telomeer)

TF- **transkriptsiooni faktorid**

TRS- *triple silencer* (kolmikmarker)

TRP- *tryptophan* (trüptofaan)

URA – **uratsiil**

wt – *wildtype* (metsiktüüp)

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmieksrakts, peptoon, dekstroos; kõiki pärmieeluks vajalikke komponente sisaldav pärmisööde)

SISSEJUHATUS

Eukarüootses rakus on DNA pakitud kõrgemat järku struktuuriks mida nimetatakse kromatiiniks. Struktuur koosneb histooni oktameerist (H2A, H2B, H3, H4), mille ümber on keerdunud 147 ap-ne DNA. Organismide elutegevuseks on oluline geeniekspressiooni regulatsioon, mida korraldavad kromatiini kokkupakituse vormid. Eukromatiiniks nimetatakse transkriptsiooniliselt aktiivset ala, kus nukleosoomid (kromatiini alauksus) on omavahel nõrgalt seotud, et geeniekspressioon saaks toimuda. Heterokromatiin tähistab kromatiini mis on tihedalt kokku pakitud ning kus geeniekspressiooni ei toimu. Pagaripärmis leidub heterokromatiini kolmes genoomes alas: ribosomaalne DNA (rDNA), paardumistüüpi määravad lookused (HMR/L) ja telomeersed alad (TEL). Kõigis neis regioonides on vaigistamise mehhanismis erinevusi. Vaigistamiskompleksi moodustumiseks on olulised vaigistuse regulaatorvalgud Sir1/2/3/4 ning abivalgud, mis varieeruvad vastavalt vaigistusale (Gartenberg, 2016).

Käesolevas töös uuriti transkriptsioonifaktorite (TF) Fkh1 ja Fkh2 mõju vaigistamisele. Forkhead TF-d reguleerivad rakkudes olulisi elulisi protsesse peamiselt läbi geeniekspressiooni kontrolli (Aref 2021). Varasemalt on näidatud Fkh1 ja Fkh2 rolli paardumistüüpi määrava lookuse (HMR/L) vaigistamisel ja selle ümbervahetamisel (*switching*) (Hollenhorst 2000, Shi, 2016), kuid vähe on teada nende valkude rollist teistes (rDNA ja telomeerid) vaigistamise piirkondades.

Antud töö teostati pärimistüvedega, milles oli deleteeritud geenid forkhead 1 (FKH1) ja forkhead 2 (FKH2), mõistmaks nende valkude mõju geenide vaigistamisele kolmes eelpool nimetatud piirkonnas. *Forkhead* valgud deleteeriti *triple silencer* (TRS) tüves, kus on eelnevalt kolme vaigistatavasse piirkonda viidud markergeenid, luues võimaluse detekteerida selektiivsõotmeil vaigistamise efektiivsust.

Töö ekperimentaalses osas näidati, et lisaks HMR lookuses vaigistamist soodustavale mõjule on Fkh1 valgul vaigistamist pärssiv mõju rDNA lookuses. Fkh2 valgul vaigistamis-seoselist rolli ei leitud.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Geeniekspressiooni regulatsioon

Geeniekspressioon on geneetilise info avaldumise protsess, mille käigus rakkudes olev pärilik materjal kodeeritakse kas ainult RNA-ks või sellest edasi ka valkudeks. Geeniekspressioon jaguneb kolmeks etapiks: transkriptsioon - DNA-lt saadava info kodeerimine mRNA-ks; RNA splaising - mRNA-lt intronite väljalõikamine; ja ribosoomides toimuv valgusüntees (de Jonge, 2020).

Antud töös keskendutakse geeniekspressiooni esmasele etapile.

Eristatakse kolme transkriptsiooni etappi- initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon.

Initsiatsiooni viib läbi RNA polümeraas II (RNAP II), mis ühineb promootoralaga DNA-l. Promootorala koosneb “core” elementidest, mille hulgas on mitmed regulatoorsed elemendid - TATA (AT-rikas ala) element, Inr (*initiator*), DPE (*downstream promoter element*), MTE (*motif ten element*), BRE (TFIIB recognition element). TATA elemendi tunneb ära TBP (*TATA-binding protein*) ja TFIID ning seondub sellele. TBP seondumist hõlbustavad TAF-id (TBP- associated factors). Järgnevalt toimub TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH, mediaatori ja RNAP II seondumine promootoralale. Tekib preinitsiatsioonikompleks (PIC) (Hahn, 2011). Elongatsioonifaasis on vaja kromatiini remodelleerijaid, et transkriptsioonifaktorid (TF) pääseksid antud regioonile ligi. Toimub 3' - 5' suunaline mRNA süntees. Terminatsioonifaasis jõutakse terminaatoralale, mille tulemusena süntees lõpetatakse (Rando, 2012). Transkriptsiooni toimumise seisukohalt on oluline, kuivõrd ligipääsetavad on transkriptsiooni masinavärgile geenide regulaatoralad. Nimelt võib tuuma-DNA olla kas tugevamini või nõrgemini kokku pakitud ning see mõjutab geeniekspressiooni (Wang, 2015).

1.2 Kromatiin

Kromatiin on raku DNA ja valkude kompleks, mis moodustab tuumas DNA kokkupakkimiseks ja seeläbi täpseks geeniregulatsiooniks. Kromatiini väikseim iseseisev üksus on nukleosoom, mis koosneb histoonide oktameerist (H2A, H2B, H3, H4) ja selle ümber keerdunud 147-st DNA aluspaarist, mis teeb struktuuri ümber umbes 1,7 kordse pöörde. Igat histoonivalku on kahes korduses- histoonipaar H3-H4 ühineb tetrameeriks, mille järel lisanduvad dimeersed H2A-H2B kompleksid. Moodustub oktameerne kompleks. Histoonidel on ka N-terminaalsed väljaulatuvad “sabad”, mis hoiavad nukleosoomi struktuuri püsivana (Joonis 1) (McGinty, 2015).

Kromatiin saab olla kahes struktuurses olekus, mille funktsioon rakus on väga erinev. *S.cerevisiae* rakkudes paikneb enamik geene eukromatiinis ehk transkriptsiooniliselt aktiivses alas, kus nukleosoomid on omavahel nõrgalt seotud, võimaldades geeniekspressiooniks vajalike valkude seondumist antud regiooniga. Heterokromatiinis on kromatiin tihedalt kokku pakitud ja geeniekspressiooni ei toimu (Bi, 2014).

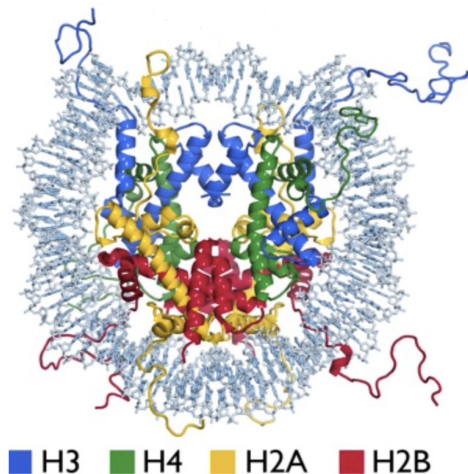
DNA pakkimine kõrgemat järku struktuuriks algab “pärlikee” struktuuri (*beads on a string*) moodustumisest, kus nukleosoomid (histoonide oktameer ja DNA) on omavahel seotud 11 nm suurusteks struktuurideks (*primary chromatin structure*). Sellist kromatiini seotust nimetatakse eukromatiiniks (Bi, 2014).

Järgmine pakkimise tase on 30 nm suuruste fiibrите moodustamine (*secondary chromatin structures*), mille tekkeks on kaks mehhanismi- solenoid- ja siksak-struktuur. Solenoid struktuuris paiknevad nukleosoomid kõrvuti moodustades vasakukäelise heeliksi. Iga heeliksi pööre koosneb 7 nukleosoomist, mis painutab *linker*-DNA-d vastavaks struktuuriks.

Siksak-struktuuri kohaselt moodustub samuti vasakukäeline heeliks, aga nukleosoomid on ühendatud sirge linker DNA-ga ja paiknevad vastakuti (McGinty, 2015). Selliselt pakitud kromatiin võib olla veel teatud piirkondades transkriptsiooniliselt aktiivne. Seepärast on kromatiini pakkimise järgmine tase vajalik transkriptsiooni täielikuks repressiooniks. Tegemist on tertsiaalse struktuuriga (*tertiary chromatin structure*), kus sekundaarse struktuuri fiibrid interakteeruvad tänu spetsiaalsetele proteiinidele (*architectural proteins*) nagu heterokromatiini proteiin (HP1), et ühendada fiibrid 400 nm struktuuriks (Woodcock, 2010).

Sellist nukleosoomide organiseeritust nimetatakse heterokromatiiniks, kus nukleosoomid on omavahel tihedalt seotud ja geeniekspressiooni ei toimu (Luger, 2012).

Nukleosoomid osalevad lisaks DNA pakkimisele ka transkriptsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni repressioonil ning selle kontrollil, raskendades transkriptsioonifaktorite ja vajalike valkude ligipääsetavust DNA-le (Wang, 2015).



Joonis 1. Nukleosoomi struktuur. DNA on kujutatud kaksikheeliksina hallikas-sinises toonis, mis ümbritseb histoonide oktaami. Iga histooni subühik on toodud erinevas värvis: H4 on kujutatud rohelisena, H3 on sinine, H2A on kollane ja H2B on punane. Joonisel on näha histoonide N-terminaalsete sabade väljaulatumist nukleosoomist (McGinty, 2015).

1.2.1 Histoonid

Histoonid on arginiini - ja lüsiinirikkad valgud, mis moodustades oktaami, suudavad oma positiivse laengu tõttu siduda negatiivselt laetud DNA-d, moodustades nukleosoomi. Histoonid koosnevad histooni voltumise domeenist (**histone fold domain**) (kolm α -heeliksit seotud kahe aasaga) ja N-terminaalsest sabast (Mariño-Ramírez, 2005).

On leitud, et H3 ja H4 N-terminaalsed domeenid seovad DNA-d, soodustades heterokromatiini struktuuri teket ja takistades transkriptsioonifaktorite seondumist DNA-le (Sperling, 2009).

H2A on vajalik tagamaks tsentromeer-kinetohoori funktsioon kromosoomide segregatsioonil (Pinto, 2000) ning H2B reguleerib transkriptsiooni, kutsudes vaigistatavasse piirkonda kromatiini remodelleerijaid, soodustades heterokromatiini teket (Zukowski, 2018).

Histooni voltumise domeen aitab igal kompleksi subühikul teineteisega seonduda ja hoida oktameeri stabiilsena. N-terminaalsed sabad ulatuvad nukleosoomi struktuurist väljapoole. Sabadel on levinud teatavad post- translatsioonilised modifikatsioonid (PTM), mille tulemusena saadakse reguleerida geenide vaigistamist, DNA protsessingut, geeniekspressiooni ja nukleosoomide struktuuri moodustumist/stabiilsena hoidmist (Mariño-Ramírez, 2005).

1.2.1.1 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

Histooni N-terminaalsete sabade modifikatsioon tähendab keemilise grupi lisamist valgule, mille käigus saab muuta raku nukleosoomide vahelist seotust ja seeläbi muuta DNA regioonid geeniregulatsiooni valkudele kättesaadavaks. Modifikatsioonid mõjutavad geenide regulatsiooni, nende kondensatsiooni, vaigistamist ja erinevaid DNA reparatsioonimehhanisme (Zaman, 2016). Histoonidel on leitud palju erinevaid post-translatsioonilisi modifikatsioone. Neist tuntumad on metüleerimine (lüsiin ja arginiin), atsetüleerimine (lüsiin), fosforüleerimine (treoniin, türosiini ja seriin), ubikvineerimine (lüsiin), ADP-ribosüleerimine (glutamaat) ja sumoüleerimine (lüsiin) (Lawrence, 2016). Üldiselt jagatakse post-translatsioonilised modifikatsioone kaheks, need, mis soodustavad geeniekspressiooni ja neid, mis seda pärsivad. See aga oleneb histoonist, modifikatsiooni tüübist ja keskkonnast tulenevatest signaalidest (Krebs, 2007). Järgnevalt käsitlem lähemalt levinumaid histoonide modifikatsioone ja nende mõju kromatiinile.

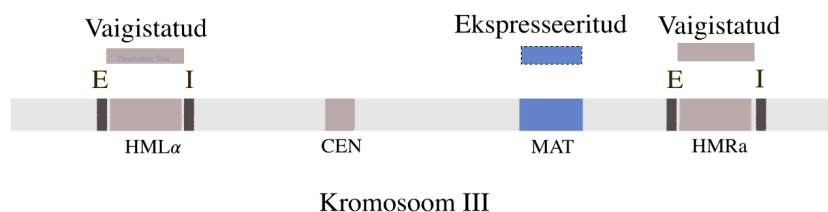
Üheks esmasena kirjeldatud histoonide modifikatsiooniks on atsetüleerimine, millele hakati tähelepanu pöörama tänu kahe ensüümi - atsetültransferaasi (HAT) ja deatsetülaasi (HDAC) uuringutele (Phillips, 1963). Atsetüleerimise käigus lisatakse atsetüülrühm lüsiini külghelale (teostab HAT), neutraliseerides selle positiivse laengu, mille tulemusena nõrgenevad histooni subühikute ja DNA-histooni vahelised interaktsioonid. HAT kasutab atsetüülrühma doonorina

1.3 Vaigistatavad piirkonnad pärmis

Geenide vaigistamine on oluline rakutsükli normaalseks toimimiseks, sealhulgas stressi vastuseks, raku kaitsemehhanismide tööks, transposoonide ning teiste mobiilsete elementide inaktiveerimiseks ja rakkude vananemises. Pagaripärmis on kolm vaigistatavat piirkonda: rDNA, paardumistüüpi määravad lookused (HMR/L) ja telomeersed alad (TEL). Vaigistamises on olulised Sir1/2/3/4 (*Silent information regulator*)- ja abivalgud. Järgnevalt on kirjeldatud kolme vaigistamispiirkonna töömehhanismi (Gartenberg, 2016).

1.3.1 Paardumistüüpi lookused (HMR/L)

HMR/L lookused paiknevad kolmanda kromosoomi kummaski õlas, HML kromosoomi lühikeses õlas ja HMR pikas. Nende vahele jääb MAT (*The Mating Type Locus*) lookus, mis oma asukohalt jääb ~100 kb kaugusele tsentromeerist ja teisel poolel olevast telomeersest alast (Joonis 2) (Haber, 2012).



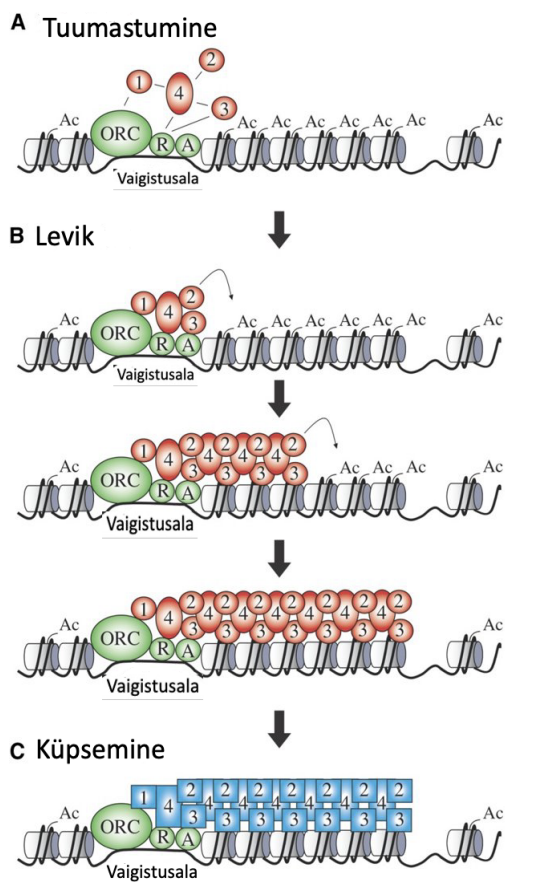
Joonis 2. HMR/L lookus. Joonisel on kujutatud lihtsustatult vaigistamispiirkondade ja MAT lookuse asetus. CEN-tsentromeer, E- *Essential for silencing*, I- *Important for silencing*, (Rääk, 2021).

HMR/L lookuse vaigistamisest saadi teada uurides MAT lookuse tööd paardumistüübi määramisel. Leiti, et MAT lookuses olev geen ekspresseerub aktiivselt, sünteesides vastavalt $\alpha 1$, $\alpha 2$ -te või $\alpha 1$, $\alpha 2$ -te, mis on olulised faktorid paardumistüübi määramisel, samas kui HMR/L lookustes, kus geenid on küll olemas, neid ei ekspresseerita (Bi, 2014).

Struktuurilt on HMR/L lookused analoogilised. Alade vaigistamise tagab a/α geeni kummalgi pool asuv E- ja I-piirkond. Selles regioonis toimub geeni vaigistamine, milles osalevad vaigistamiskompleksi moodustamiseks olulised Sir valgud. E-piirkond on vaigistamiseks hädavajalik, I-ala puudumisel töötab vaigistamine vaid osaliselt. E-piirkond koosneb omakorda eripärastest nukleotiidsetest järjestustest nimega a, e ja b, millega vaigistamiskompleksi moodustamiseks vajalikud valgud liituvad. Mutatsioonide puhul ühe spetsiifilise järjestuse (a, e ja b) puudumine ei mõjuta vaigistamist, aga kui puudu on 2/3-st regioonist, siis vaigistamist ei toimu. Replikatsiooni alguspunkti ära tundev valk ORC (*Origin recognition complex*) seondub a-alas, Rap1 (*Repressor Activator Protein*) e-alas ja Abf1 (*General regulatory factor*) b-alas. Selline valgukogum on alustalaks vaigistamiskompleksi moodustumisele. (Madhani, 2005)

Vaigistamismehhanism jaguneb tuumastumiseks, levimiseks ja küpsemiseks (Joonis 3). Esimene kirjeldab esmase Sir 1/2/3/4 kompleksi valkude seondumist vaigistusosalal olevate valkudega (ORC, Rap1, Abf1). Täpsemalt toimub interaktsioon ORC N-terminaalse saba ja Sir1 C-terminaalse osa vahel. Sir1 C-terminaalne osa seob endaga ka Sir4. Sir4 C-terminaalne osa on seotud Sir3-e ja tsentraalne domeen on seotud Sir2-ga. Viimase seondumine Sir4-ga "käivitab" deatsetülaasi (Sir2), et see saaks deatsetüleerida histoonide H3 ja H4 N-terminaalsetele sabadel asuvaid aminohapejääke- H3K9, H3K14, H3K18 ja H4K16 (Imai, 2000).

Deatsetüleerimine võimaldab edasistel Sir2/3/4 kompleksi valkudel seonduda nii, et Sir2/3/4 kompleksist moodustub justkui valkude kaskaad, mis katab kromatiini ja ei lase geeniekspressioonil toimuda. Seda protsessi kutsutakse levikuks. Küpsemine on seotud vaigistamise lõppemisega. Genoomis on olemas teatavad "barjäärid", mis koguvad kokku transkriptsioonifaktoreid ja soodustavad histooni "sabade" atsetüleerimist et võimaldada eukromatiini teket. On leitud, et nukleotiidsed alad, kus on palju T-aluseid soodustavad vaigistamise blokeerimist (Bi, 2014; Gartenberg, 2016).



Joonis 3 Vaigistamine HMR/L-lookustes: tuumastumine, levik ja küpsemine.

Joonisel on kujutatud vaigistamise olemus etapiti, koosnedes tuumastumisest (A), levikust (B) ja küpsemisest (C). A: Esmase Sir 2/3/4 kompleksi ühinemine ORC ja Rap1-ga, mille järel saavad kaskaadina ühineda ka teised valgud. B: Sir 2/3/4 kompleksi levimine vaigistatavas alas. Antud piirkond on vaigistatud ja transkriptsiooni ei toimu. C: Küpsemine tähendab vaigistamiskompleksi töö lõppemist. Joonisel kasutatud värvelementide seletus: Roheline: ORC- *Origin* ala ära tundev järjestus, R-Rap1, A-Abf1; Punane: 1- Sir1, 2-Sir2, 3-Sir3, 4-Sir4; Sinine: kompleks on paigale kinnitunud- 1- Sir1, 2-Sir2, 3-Sir3, 4-Sir4 (modifitseeritud Gartenberg, 2016 järgi).

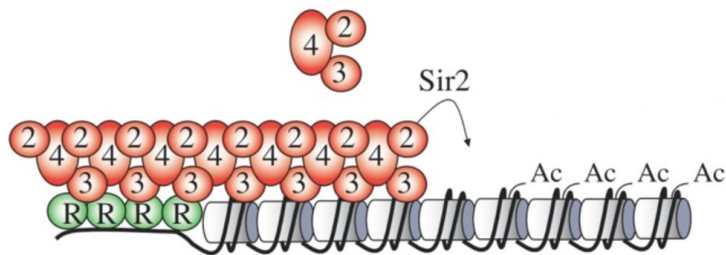
1.3.2 Telomeerid

Telomeerid on lühikeste kordusjärjestustega struktuurid kromosoomi otstes, mis kaitsevad kromosoomi degradatsiooni ning rakkude jagunemisel tekkida võivate geenivigade eest. Telomeeride pikkus sõltub transposaasi (ribonukleoproteiinist ensüüm) aktiivsusest ning pagaripärmis on levinud (TTAGGG)_n nukleotiidsed kordused 3' suunal, millega vaigistamiskompleks saab liituda. Heterokromatiini struktuur saavutatakse histooni N-terminaalsete "sabade" H4K16 deatsetüleerimisel ja H3K79 metüleerimisel. Sageli esineb telomeerides ka H2A.Z histooni modifikatsiooni H2A asemel, sest H2A.Z osaleb telomeerses alas esineda võivate kaheaahelaliste katkete parandamises (Kupiec, 2014; Hollenhorst, 2000).

Telomeerses alas on palju DNA mittekodeerivaid järjestusi ja transposoone, mis peavad olema vaigistatud, et puuduks võimalus homoloogseks rekombinatsiooniks teiste genoomis olevate geenipiirkondadega (Flint, 1997).

Telomeerne vaigistamine algab Rap1 seondumisega TG1–3 järjestusele, mis on nukleosoomidest vaba ala. Valgu seandumiskohti on ~20 bp järel ja nende aladega liitub umbes 15-20 Rap1 molekuli. Telomeersete alade pikkus pagaripärmis on keskmiselt 300 ap (Wellinger, 2012). Rap1-e seandumine DNA-ga võimaldab Sir2/3/4 kompleksi seandumise kromatiiniga, mida stabiliseerib yKu 70/80 (*yeast KU complex*) kompleks. Tegu on kompleksvalguga, mis interakteerudes Sir4-ga tagab vaigistamismehhanismi stabiilsuse ja ühtlasi ka Sir2/3/4 leviku (Kupiec, 2014). Seondunud Sir2/3/4 kompleks interakteerub H3 ja H4 histooni deatsetüleeritud "sabadega" selleks, et hoida kompleksi kindlalt paigal (Joonis 4). Deatsetüleerijaks on Sir2, mis eemaldab H4K16 atsetüülrühma (Madhani, 2005). Vaigistamine lõppeb terminatsioonijärjestusel, mis on tavaliselt T-aluste rohke (Wellinger, 2012).

Oluline erinevus HMR/L lookuste vaigistamisega on, et selles, et mehhanismi töös puudub Sir1 valk. Samuti puuduvad abialgud ORC ja Abf1 (Gartenberg, 2016).



Joonis 4. Telomeeride vaigistamine. Joonisel on kujutatud telomeeride vaigistamist. Rohelisena on kujutatud Rap1 valku; Sir2/3/4 kompleks (punane) ühineb Rap1-ga ning kandub kromatiinile. Sir2 deatsetüleerib (Ac eemaldamine) histoonide sabasid (Gartenberg, 2016).

1.3.3 rDNA

Kolmandaks pärmis vaigistatavaks piirkonnaks on ribosomaalset RNA-d kodeeriv geeniregioon. rRNA on ribosoomi struktuuri ja funktsionaalsuse jaoks vajalik komponent, kuid enamasti on see üldise genoomi stabiilsuse tagamiseks vaigistatud olekus, et vältida DNA-sse vigu tekitada võivat homoloogilist rekombinatsiooni (Caridi, 2017).

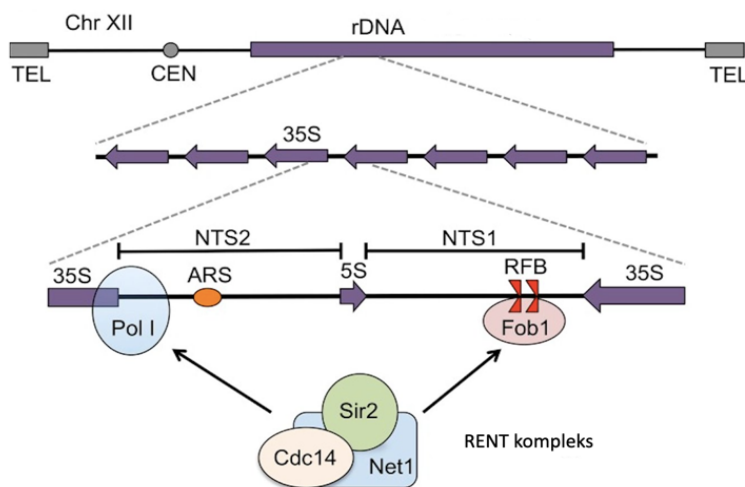
rDNA paikneb XII kromosoomis ning kodeerib Pol I poolt transkribeeritavat 35S prekursor rRNA-d ja Pol III poolt transkribeeritavat 5S rRNA-d (Joonis 5). 35S ja 5S regioonid on omavahel lahutatud *spacer*-DNA-ga, mille nimed on vastavalt NTS1 (*nontranscribed spacer 1*) ja NTS2 (*nontranscribed spacer 2*) (Granneman, 2005). Selliseid, rDNA lookuses olevaid järjestusi on pagaripärmil umbes 150-200 koopiat, millest üks ühik on 9.1 kb suurune (Petes, 1979). NTS2 alas on olemas autonoomne replikatsiooni element (ARS). NTS1 alas on RFB, millega on ühinenud Fob1 valk, mis vastutab vaigistamise eest rDNA-s. RFB ülesandeks on ära hoida replikatsioonikahvli moodustumist ja lõpetada Pol I töö vastava terminatsioonijärjestusega (Gartenberg, 2016).

Vaigistamiskompleksi moodustumiseks rDNA-s on oluline RENT (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*) kompleksi moodustumine. RENT koosneb Cdc14, Sir2 ja Net1 valgukompleksist. Esmalt seostuvad omavahel Net1 ja Cdc14 ning peale Fob1 C-terminaalse

domeeni fosforüliseerimist saab kompleksiga liituda ka Sir2 (Zaman et al. 2016). Sir 2 on ainuke Sir valkudest, mis osaleb vaigistamisel rDNA-s. Tema peamine ülesanne RENT kompleksis on deatsetüleerida H3 ja H4 histooni “sabasid”, sest vastasel juhul ei saa kompleks seonduda DNA-ga (Ide, 2013).

Kui RENT kompleks on oma kohale kinnitunud, jätkub Sir2/3/4 tööle HMR/L lookuses sarnane levimise protsess, mille käigus vaigistatav ala “kaetakse” RENT kompleksiga (Buck et al. 2002). rDNA vaigistamise eripäraks on, et see kulgeb alati tsentromeeri suunas, mitte telomeeri ja lõppeb tRNA geenijärjestusega [tQ(UUG)L] (tRNA-Gln) (Biswas et al. 2009).

rDNA vaigistamise olulisus seisneb genoomi stabiilsuse tagamises. Uuringutega on leitud, et eemaldades Sir2-e vaigistamiskompleksist, muudab see rakud ebastabiilseks; madala rDNA koopiaarvu puhul toimub tihedamini geeniekspressioon ja homoloogiline rekombinatsioon, mis võib viia ekspresioonivigadeni (Gartenberg, 2016).



Joonis 5. rDNA vaigistamine. Joonisel on näha XII kromosoomi vaigistamist. rDNA-s on 35S-5S-35S regioon, mille vahele jäävad NTS1 ja NTS2 mittekodeerivad alad. Joonise alaosas on vaigistamismehhanismis olulisim komponent- RENT kompleks. RENT kompleks seondub RNA Pol I-ga, et alustada transkriptsiooni 35S suunal ja RFB-l (*Replication fork block*) olevale Fob1 valgule, et alustada vaigistamise protsessiga (Gartenberg, 2016).

1.4 Forkhead valkude perekond - Fkh1 ja Fkh2

Fkh1 ja Fkh2 puhul on tegemist Fox perekonna TF-dega, mille spetsiifilised domeenid on konserveerunud pärmist imetajateni, kuid huvitaval kombel taimedes puuduvad. Tegu on valkudega, mis on pagaripärmis olulised raku elutegevuseks, kuid mitte essentsiaalsed. Läbi transkriptsiooni kontrolli mõjutavad nad paljusid rakulisi protsesse nagu apoptoos, rakutsükli regulatsioon, vastus oksüdatiivsele stressile, autofaagia, diferentseerumine ja DNA reparatsioon (Aref, 2021).

S. cerevisiae'l on Fox perekonna valke neli: Fkh1 (*Forkhead homolog 1*), Fkh2 (*Forkhead homolog 2*), Fhl1 (*Forkhead like 1*) ja Hcm1 (*High copy supressor of calmodulin*) (Linke, 2013). Fkh1 ja Fkh2 koosnevad DNA-d siduvast domeenist (DBD), mida tuntakse ka *forkhead* domeenina ja *forkheadiga* seotud domeenist (*forkhead-associated domain*; FHAD) (Murakami 2010). Lisaks on Fkh2-l pikk C-terminaalne osa, milles on leitud 6 tsükliin-sõltuvate kinaaside fosforühaberleerimiskohta (Malumbres, 2014).

Forkhead domeen vastutab eelkõige seondumise eest spetsiifilistele DNA järjestustele ning ka Fkh1 ja Fkh2 valkude seondumise eest CLB2 klasteri teiste regulaatorvalkudega (näiteks Mcm1). FHAD on aga oluline rakkude kasvu kontrollis ning CLB2 klasteri transkriptsiooniks. CLB2 klasteris on umbes 35 geeni. Nende geenide ülesanne on kontrollida rakutsükli kontrollpunktis (G2 faasis), kas geeniekspressioon on toimunud vigadeta, et minna üle M-faasi (mitoos). Selles klasteris on Fkh1 transkriptsiooni represseeriv, aga Fkh2 transkriptsiooni soodustav (Jin, 2020). Erinevusi nende kahe valguga vahel ilmneb veel. Nimelt on Fkh1 ülesandeks replikatsiooni alguspunktide töö õigeaegne algatamine, Fkh2 sellist replikatsiooni-seoselist rolli pole täheldatud, küll aga võib ta Fkh1 replikatsiooni alguspunktidel asendada, kui viimane on deleteeritud (Knott, 2012). Ühiselt hoiavad Fkh 1 ja Fkh2 ära rakkude pseodohüüfilist kasvu (kasv stressi tingimustes) (Hollenhorst, 2000).

Seni on näidatud, et Fkh1 ning vähesel määral ka Fkh2 valgud on seotud pagaripärmi paardumistüübi lookuse vaigistamisega ja Fkh1 on oluline pärmi paardumistüübi vahetusprotsessis (Haber, 2012). Fkh1 on HMR lookuses vaigistamist soodustav valk, mis suudab asendada ka Sir1-te tema töös, kuid Fkh1 deleteerimine vaigistamisele tugevat mõju ei avaldanud (Hollenhorst, 2000). Katses uurimaks Fkh1 ja Fkh2 seondumist erinevates

rakutsükli faasides erinevatele geeniregioonidele ilmnes, et telomeeride puhul oli valkude seondumine sage G1 ja varajases S- faasis, kuid mitte G2/M faasis ehk võib oletada, et telomeersel alal nad pigem soodustavad geeniekspressiooni toimumist (Ostrow, 2014). Andmed Fkh1 ja Fkh2 mõjust rDNA vaigistamisele seni puuduvad.

1.5 Mudelorganism *Saccharomyces cerevisiae*

Uurimistöös kasutatavaks mudelorganismiks on *Saccharomyces cerevisiae* ehk pagaripärm, mis tänu oma kiirele kasvule ja lihtsale ehitusele leiab tänapäeval laialdast kasutust teadusuuringutes. Tema pooldumisaeg on umbes 90 min, võrdlusena inimrakkude jagunemine võtab aega keskmiselt 24h-72h (Duina et al., 2014). Seega on ta laboritingimustes sobiv mudelorganism, tänu oma kiirele kasvule, lihtsale kasvutingimustele ja mitmekülgseid muutusi soosivale genoomile. Samuti ei ole ta patogeenne, mistõttu ei pea temaga rakendama eritalitlusi.

Tegu on eukarüootse organismiga, kelle genoom moodustub 16-st haploidsest kromosoomist, mille pikkused jäävad vahemikku 200-2200 kb. Genoomis on 6183 lugemisraami (ORF), millest tsirka 3,8% sisaldavad introneid. Teiste hulkraksetega võrreldes on pagaripärmi genoom palju kompaktsem, võimaldades kloonimist ja erinevaid geenitehnoloogia alaseid katseid (Sherman, 2002).

Haploidsetel rakkudel on kaks paardumistüüpi- a ja α . Vastaspaardumistüübi rakud võivad omavahel paardudes moodustada a/α diploidi, mis võib pungumise käigus muutuda tagasi haploidiks. Rakutsükkel on pärmil sarnane teiste eukarüootidega, koosnedes S-, M-, G1- ja G2-faasist. S-faasis toimub DNA replikatsioon, M-faasis mitoos ja G1- ja G2-faasis rakud kasvavad ning nendes vahepunktides kontrollitakse replikatsiooni õnnestumist (Rine, 1989).

S.cerevisiae-d kasutatakse teadusuuringuteks ning biotehnoloogias bioremediatsioonis nt vete puhastamiseks raskmetallidest. Lisaks rakendatakse pagaripärmi biokatalüsaatorina, et toota vajalikke keemilisi ühendeid. Meditsiinis püütakse lahendada raku vananemisega seotud küsimusi (Gartenberg, 2016).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Forkhead transkriptsioonifaktorid reguleerivad rakkudes olulisi elulisi protsesse peamiselt läbi geeniekspressiooni kontrolli. Varasemalt on näidatud Fkh1 ja Fkh2 rolli paardumistüübi määrava lookuse (HMR/L) vaigistamisel (Shi, 2016).

Meie töögrupi seni avaldamata katsetes täheldati, et uurides mass-spektromeetria meetodil Fkh1 valguga pagaripärmi rakulüsaadis seonduvaid valke, oli nende hulgas mitmeid rDNA-seoselisi valgukomplekse. Kuna rDNA on üks vaigistatavatest aladest pagaripärmis, kerkis üles küsimus, kas Fkh1 valk võiks olla oluline ka telomeeride ja rDNA vaigistamisel. Kuna Fkh1 ning Fkh2 valgud on homoloogid ning omavad nii kattuvaid kui eraldiseisvaid funktsioone, soovisime kindlaks teha ka Fkh2 valgu rolli erinevate piirkondade vaigistamisel.

Kogu töö põhines kahel suuremal etapil. Esiteks pärmütüve konstrueerimine, kus Fkh2 geen oleks deleteeritud ning kus on eelnevalt kolme vaigistatavasse piirkonda viidud markergeenid, luues võimaluse detekteerida selektiivsöötmeil vaigistamise efektiivsust. Seejärel viia läbi võrdlevad katsed Fkh1 ja Fkh2 deletsioonitüvedega kasutades lahjendusrea meetodit.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud tüved ja plasmiidid

Töös kasutatud pärmütüved põhinevad laboritüvel W303. Fkh1 ja Fkh2 valkude mõju vaigistamisele uuriti kasutades pärmütüve, kus oli võimalik kindlaks teha vaigistamise esinemine või puudumine kolmes pagaripärmi vaigistatavas piirkonnas (telomeer, HMR lookus ja rDNA lookus) tänu neisse aladesse sisestatud markergeenidele. Algne, nn kolmikmarker (*triple silencer; TRS*) tüvi (AKY 1455, Ray, 2003) saadi kingina Kurt W. Runge laborist. Selle tüve tetraadide analüüsil isoleeriti nn kohalik metsiktüüpi tüvi AKY2344. Viimast modifitseerides konstrueeriti Fkh1 geeni (AKY2289) ja Fkh2 geeni

(AKY2363) deletsiooniga pärmitüved. Käesoleva töö autor konstrueeris Fkh2 deletsioonitüve. Rakkude kasvu hindamiseks lahjendusrea meetodil kasutati katses kontrolltüvedena AKY1493, milles on genoomist eemaldatud vaigistamisel olulise valguga, Sir2, geen.

Käesolevas töös kasutati plasmidi 3x1E2-KanMX, milles olev markergeen KanMX asendas Fkh2 geeni tüves AKY2344. Tüvede nimetused, genotüübid ja autorid on toodud Tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud tüvede genotüübid ja autorid

Tüvi	Kirjeldus	Päritolu
AKY1493	W303, MAT alpha; hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, Δ Sir2	Kersti Kristjuhan
AKY2289	W303, MAT alpha; hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535; Δ Fkh1	Signe Värv
AKY2344	W303, MAT alpha; hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, WT	Signe Värv
AKY2363	W303, MAT alpha; hmrE::TRP1, ChrV-R-URA3, rdn1::ADE2-CAN1, rad5-535, Δ Fkh2	käesolev töö

2.2.1.1 Triple silencer meetod

S.cerevisiae rakkudes vaigistatakse kolme piirkonda: paardumistüüpi määravad lookused (HML/HMR), rDNA ja telomeersed alad (TEL). Nende piirkondade põhjalikumaks uurimiseks on loodud nn kolmikmarkeritega ehk *triple silencer* tüvi (TRS) (AKY1455, Ray, 2003), kus nendesse regioonidesse on paigutatud markergeenid, mis lubavad raku kasvu hindamisel selektiivsöötmel järeldada, kas antud piirkond on vaigistatud või mitte.

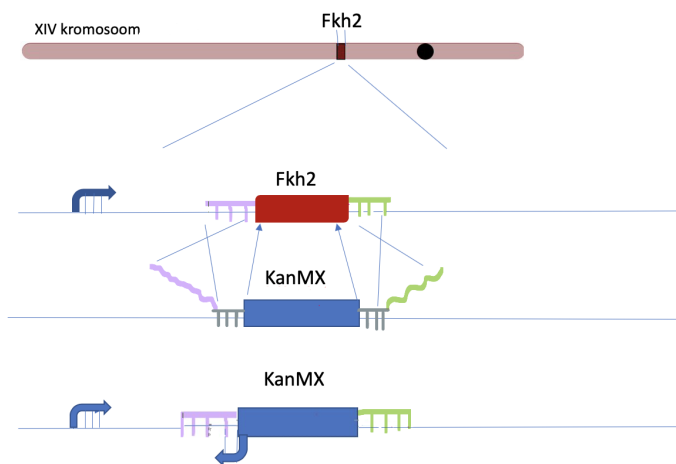
Paardumistüüpi määravasse lookusesse (HMR, mis on tavaolukorras vaigistatud) on paigutatud trüptofaani sünteesiks olulist ensüümi kodeeriv geen (TRP1). Kui geen on vaigistatud, siis rakud trüptofaani mitte sisladaval söötmel (-TRP) ei kasva. CAN1 geen, mida rDNA lookuses markerina kasutati, kodeerib arginiini transposaasi. W303 algse laboritüves on CAN1 geen muteeritud. Kui CAN1 on aga funktsionaalne, tuuakse rakkudesse keskkonnast võimalusel ka kanavaniini (arginiini analoog), mille inkorporatsioon valkudesse translatsiooni käigus muudab valgud mitte-funktsionaalseks ning seega põhjustab rakkude surma. Seega CAN1 vaigistamine tähendab rakkude kasvu selektiivsöötmel (+CAN). Telomeeride regiooni on paigutatud URA3 markergeen. Kui geeniekspressioon toimub ning toodetakse URA3 geeniprodukti, siis antud ensüüm modifitseerib 5-FOA-d, tootes toksilise ühendi, mis on pärmirakkudele surmav. Kui URA3 geen on vaigistatud, saavad rakud 5-FOA söötmel kasvada (Ray, 2003).

2.2.2 Kasutatud söötmed

S.cerevisiae tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) tardsöötmel. Transformatsiooniks kasutatud tüve AKY 2344 kasvatati YPD vedelsöötmes. Lahjendusrea meetodil pärmirakkude kasvu hindamiseks kasutati järgnevaid selektiivsöötmeid: 5-FOA, -URA, +CAN, -ADE, -TRP, +AA. Lisas 1 on kirjas antud töös kasutatud söötmed koos nende täpse koostise ja kasutamise eesmärkidega.

2.2.3 Deletsioonikasseti paljundamine PCR meetodil

Töö alaeesmärk oli konstrueerida pärmitüvi, milles on eemaldatud Fkh2 geen, mis on asendatud KanMX markergeeniga. Selleks kasutati plasmidi 3x1E2-KanMX, milles olevat KanMX markergeeni paljundati PCR (*Polymerase chain reaction*) meetodil. Paljundatud geenifragmendi külgnevad nukleotiidsed järjestused, nii 5' kui ka 3' suunas olid komplementaarsed Fkh2 valku kodeeriva ala 5' ja 3' külgnivate aladega. Komplementaarsuse tõttu toimub DNA ahelate vahel homoloogiline rekombinatsioon ja Fkh2 geen asendub KanMX geeniga (Joonis 6). Transformatsiooni õnnestumist kontrolliti selektiivtassil rakkude kasvu ning koloonia-PCR meetoditega.



Joonis 6. Deletsioonikasseti tööpõhimõte. Kujutatud on deletsioonikasseti vahetumist pärmi genoomis oleva Fkh2 geeniga homoloogilise rekombinatsiooni meetodil. Lilla ning rohelise värviga on välja toodud Fkh2 geeni 5' ja 3' alad, mis sünteesiti PCR-i käigus ka KanMX geeni otstesse (Fkh2-5'-KanMX-Fkh2-3' konstrukti). Halliga on välja toodud KanMX geeni 5' ja 3' alad. Sinised nooled tähistavad kontrollprimereid: Fkh2-CTRL (suunaga paremale) ja FBA1_ctrl_2 (suunaga vasakule).

KanMX markergeeni amplifitseeriti PCR meetodil praimerite FKH2-KO-5' 5'
CTTTATTGAAACTTTATCAATGCGCAAGAAATGTCCAGCAGCAATTTTAA
GATAGCTCATTTTGGAGTTCG 3' ja FKH2 - 3xTAG_R-ga 5'-
CCATTTCTCATTTCATTTCTTTAGTCTTAGTGATTCACCTTGTTTCTTGTC
CAGGAAACAGCTATGACCATG-3' -ga. PCR-i reaktsioon viidi läbi 50 µl
reaktsioonisegus, mis sisaldas 2 µl (10 ng/µl) plasmidi, 2 µl (10 pg/µl) praimereid
FKH2-KO-5' ja FKH2 - 3x TAG_R, 1 µl DNA polümeraasi (*Thermo Scientific Phusion
DNA Polymerase*) 5 U/µL, 1 µl dNTP (5 mM), 10 µl 5 x DreamTaq puhvrit, milles oli tootja
poolt lisatud 20 mM MgCl₂ (*Thermo Scientific*) ning 32 µl vett. Proove oli kolmes korduses.
PCR tööks kasutati vastavat programmi:

Algne denaturatsioon: 98 °C 1 min

Denaturatsioon: 98 °C 10 sek
Praimerite seondumine: 60 °C 20 sek
Ekstensioon (sünteesifaas): 72 °C 45 sek
Kokku 30 tsükli

Lisækstensioon: 72 °C 5 min
Proovide hoidmine: 12 °C ∞

Amplifitseeritud fragmendi olemasolu ja pikkust kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga. DNA sadestamiseks tõsteti PCR segu uude 1,5 ml tuubi ja lisati sellele 150 µl piiritust (EtOH, 96%). Edasi segati proovi vortexil ja tsentrifuugiti (3 min 15 000 rpm), misjärel eemaldati supernatant. Seejärel lisati 20 µl NaAc (3M)(*Sodium Acetate Solution*, pH 5.2), tsentrifuugiti 15 min 13 000 rpm +4 °C juures. Eemaldati supernatant ning lisati 500 µl EtOH (70%), tsentrifuugiti 5 min max pööretel. Pinnal olev vedelik eemaldati ja sadet kuivatati 30 °C juures 15 min. DNA võeti üles 20 µl-s TE-puhvris (10 mM TrisHCl; pH 7,5; 1 mM EDTA).

2.2.4 Pagaripärmi transformatsioon LiOAc meetodil

Pärmitüve AKY2344 kasvatati YPD tassil ööpäev 30°C juures. Seejärel külvati rakud YPD vedelsöötmesse. Vedelkultuur asetati üleöö loksutisse (*Excella E25 Incubator Shaker Series*) 30°C juurde. Üleöö kasvanud rakukultuurist võeti 100 µl ja lisati sellele 400 µl isotoonilist

lahust (0.9% NaCl, 0.1%NaN₃), et mõõta rakukultuuri tihedust. Seejärel proov sonikeeriti (*Diagenode Bioruptor Sonication System Standard*) selleks, et kindlustada parem rakkude lahutamine üksteisest, et mõõtmine oleks võimalikult täpne. Seadme meetoodika põhineb helilainete kõrge sagedusega võngete võimelt rakkudega interakteeruda ja neid teineteisest lahutada. Rakke sonikeeriti 7 sekundit ning seejärel kanti proov rakuloenduri katsutisse (ZTM COULTER COUNTER *Cell and Particle Counter, Beckman Coulter*). Proovile lisati 9.5 ml isotoonilist lahust, mis asetati rakke mõõtva klaaspulga alla. Rakkude soovitud tihedus jäi 10⁶ -10⁷ rakku/ml juurde. Antud proovis oli aga liiga palju rakke, mistõttu tuli rakukultuuri lahjendada. Rakkude esmasel mõõtmisel näitas loendur 2.7 x 10⁸ rakku/ml, seepärast proovi lahjendati (25 ml YNB vedelsöödet, 830 µl rakukultuuri). Uue lahjendusega rakukultuur asetati uuesti loksutisse 30 min-ks. Protsessi korrati ning transformatsiooniga alustati kui rakutihedus oli 1.012 x 10⁷ rakku/ml-s.

Transformatsiooniks kanti 1ml rakususpensiooni üle 1.5 ml tuubidesse ja tsentrifugeeriti 3 min 5000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*). Seejärel eemaldati supernatant. Protsessi korrati. Rakusademele lisati 500 µl LiOAc (0.1 M)+TE puhvris ning tsentrifugeeriti 3 min 5000 rpm. Eemaldati puhvri komponent. Järgnevalt lisati rakkudele 40 µl LiOAc+TE-d. Proovile lisati 7 µl *carrier* DNA (eelnevalt hoiti 95 °C juures, järgnevalt jääl 1 min) ja 8 µl plasmidi. Segu suspendeeriti ning hoiti 5 min toatemperatuuril. Transformatsiooniseadused seisisid 5 min toatemperatuuril, peale mida lisati 300 µl LiOAc+TE+PEG (0,1 M liitiumatsetaat + TE, 40% PEG (Mw = 40 000)) lahust, segati vortexil (*Scientific Industries Vortex-Genie 2*) ja hoiti toatemperatuuril 15 min. Lisati 30 µl DMSO-t (*Dimethyl sulfoxide*), segati uuesti vortexil ja tehti 42 °C juures 10 min-line kuumašokk. Proovi tsentrifugeeriti 3 min 3000 rpm juures, eemaldati supernatant, sade lahustati 150 µl vees. Rakud plaaditi G-418 selektiivsöötme tassile ning inkubeeriti 30°C juures 3 ööpäeva.

2.2.5 Transformatsioonil saadud pärmikolooniate õigsuse kontrollimine PCR-i abil

3 ööpäeva 30°C juures kasvanud kolmest pärmikolooniast eraldati DNA ja kontrolliti transformatsiooni õnnestumist. G-418 selektiivsöötmetassidelt pipeti otsaga võetud kolooniad

suspendeeriti 100 µl-s LiOAc+SDS (LiOAc 1M, 10% SDS) puhvril, hoiti 15 min 70°C juures ning lisati 300 µl EtOH (96%), proovi segati vortexil ja tsentrifuugiti 3 min 15 000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*). Eemaldati supernatant. Edasi lisati proovidele 400 µl EtOH (70%) ja eelnev protsess kordus. Supernatandi eemaldamisel sadet kuivatati 15 min 40 °C juures ning seejärel võeti üles 50 µl-s TE-puhvril, tsentrifuugiti 15 sek 15 000 rpm juures ning supernatant eraldati uude tuubi. PCR reaktsiooniks võeti 1 µl DNA-d.

PCR-i reaktsioon viidi läbi 10 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 1 µl LiOAc meetodil eraldatud DNA-d, 5 µl puhvrit (*DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*), mis sisaldab DNA polümeraasi, MgCl₂ ja dNTP-d, praimereid: 1 µl FKH2-CTRL (10 pg/µl) ja 1 µl FBA1_ctrl_2 (10 pg/µl) ning viimasena 2 µl vett.

PCR tööks kasutati vastavat programmi:

Algne denaturatsioon: 95 °C 3 min

Denaturatsioon: 95 °C 25 sek

Praimerite seondumine: 56 °C 25 sek

Ekstensioon (sünteesifaas): 72 °C 45 sek

Kokku 30 tsükli

Lisaekstensioon: 72 °C 5 min

Proovide hoidmine: 12 °C ∞

Amplifitseeritud fragmendi olemasolu pärmi genoomis ja selle pikkust kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga. Kolooniad olid tähistatud vastavalt C1, C2 ja C3. Saadud info põhjal valiti välja koloonia C2. Valituks osutus see koloonia, mille signaal oli kõige tugevam. Teades missugustel kolooniatel transformatsioon õnnestus, võeti G-418 selektiivsöötmetassilt tiku otsaga C2 osa kolooniast ning kanti pindküvi meetodil hambaorgiga YPD tardsöötmetassile ja pandi 2 ööpäevaks 30°C juures kasvama. Pärast 2 ööpäeva tehti kasvanud pärmirakkudest püsikultuur. Selleks pandi spetsiaalsesse -80 °C taluvasse tuubi 1 ml glütserooli (50%) ja võeti YPD tassilt nii palju rakke kui sai ning segati läbi glütserooliga. Seejärel pandi tüvi -80 °C külmkappi. Uue tüve nimetuseks sai AKY 2363.

2.2.6 Agaroosgeelelektroforees

Käesolevas töös läbi viidud PCR-i ja transformatsiooni produktide analüüs teostati agaroosgeelelektroforeesiga. Sõltuvalt uuritava DNA nukleotiidjärjestuse pikkusest (KanMX - 1675 ap, koloonia-PCR kontroll- 522 ap) kasutati 1 % agaroosgeeli, mille valmistamiseks kasutati 1x TAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) ja etiidiumbromiidi (EtBr)(0,5µg/ml). Geeli jooksutamiseks kasutati (*multiSUB Choice, Wide Midi Horizontal Electrophoresis System*), 100 V pinge juures.

2.2.7 *S.cerevisiae* rakkude kasvu hindamine lahjendusrea meetodil

Rakkude kasvu hindamiseks lahjendusrea meetodil kasutati AKY1493, AKY2289, AKY2363 ja AKY2344 tüvesid. Iga tüvi võeti üles üleöö 30 °C inkubaatoris olnud YPD tardsöötmetelt. Rakke võeti tassidelt steriilse hambaorgiga ja segati 400 µl vees, täiendavalt segati vortexil. Proovist võeti 100 µl ja lisati sellele 400 µl isotoonilist lahust. Proove segati täiendavalt vortexil. Järgnevalt proove sonikeeriti 7 sek ja pandi spetsiaalsesse mõõtenõusse (500µl), millele lisati 9.5 ml isotoonilist lahust, mis seejärel asetati rakuloendurisse. Mõõdeti rakususpensiooni tihedust, et saaks hakata lahjendusi tegema. Suurima tihedusega lahjenduses taheti saada 10 000 rakku/µl, väikseimas 1 rakku/µl ehk et iga järgnev lahjendus oleks eelnevast 10x väiksem.

Algset rakutiheduse näitu loeti rakuloendurist. Kui näit oli ligikaudu $n \times 10^7$ rakku/µl, siis arvutati suurima rakutihedusega lahjenduseks sobiv kogus vett ja rakususpensiooni. Esimeseks lahjendusrea täpis pidi olema 10 000 rakku/µl.

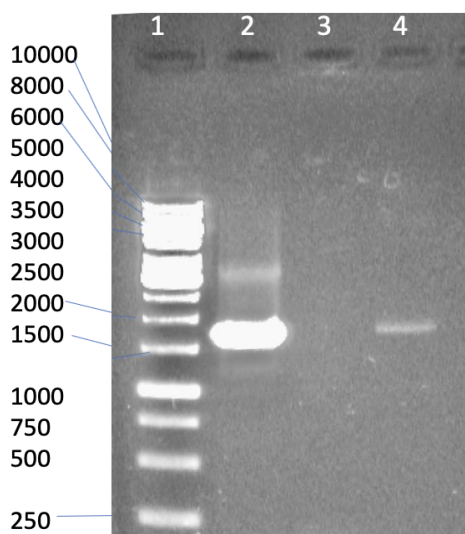
Iga järgmise lahjenduse puhul võeti eelmisest proovist 20 µl lahjendust ja lisati sellele 180 µl vett. Proovid kanti 5x6 ruudustikku selektiivsöötme tassidele. Igasse ruutu pipeteeriti 5 µl. Külvatud pärmitüvesid inkubeeriti 30°C juures 3 ööpäeva. Rakkude kasvu jälgiti igapäevaselt ning katse tulemused jäädvustati skaneerides .jpg formaadis.

2.3 Tulemused

2.3.1 Fkh2 deletsiooniga pärmitüve konstrueerimine

Fkh2 geeni deletsiooniga pärmitüve konstrueerimine algas markergeeni paljundamisega. Fkh2 asendavaks markergeeniks valiti antibiootikumile G418 resistentsust tagav KanMX geen. KanMX geeni matriitsiks oli pBlueScripti vektrosüsteemil baseeruv plasmiid 3x1E2-KanMX, mis on varasemalt konstrueeritud K.Kristjuhani poolt. Fkh2 lookusega homologseid alasid ning KanMX geeni sisaldavat fragmenti paljundati PCR meetodil, kasutades sünteesis primereid FKH2-KO-5' ja FKH2 -3x TAG_R. Saadud produkte kontrolliti agarosgeelelektroforeesil. PCR proovid visualiseeriti UV kiirguse abil (Joonis 7).

Joonisel 7 kasutati esimesel rajal DNA-suurusmarkerit, mis näitab, et PCR-i produkt (rada 2, 4) vastab oodatud 1675 aluspaari pikkusele. Lisaks sellele on rada 2-l näha veel märksa heledama signaalina KanMX matriits-plasmidi. Kolmandal rajal oli ebaõnnestunud proov, kus pole KanMX paljundamine õnnestunud.



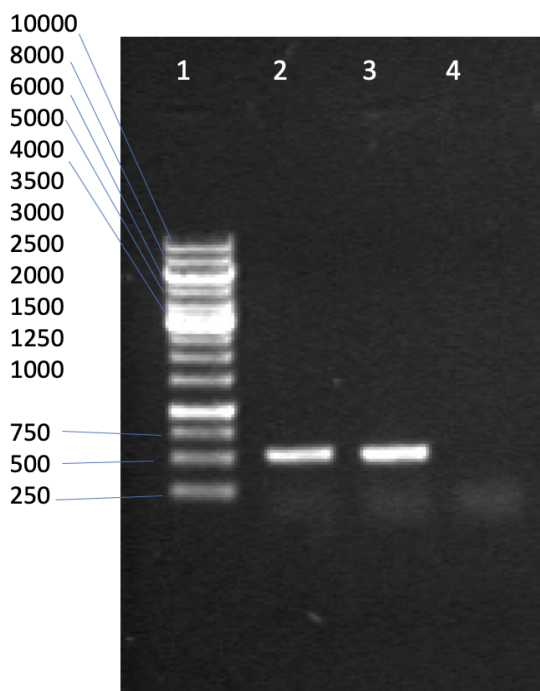
Joonis 7. Transformatsiooniks kasutatava Fkh2-5'-KanMX-Fkh2-3' geenikonstrukti paljundamine PCR-meetodil. Rajal 1 on DNA-suurusmarker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*), rajal 2 ja 4 on KanMX markergeen, rajal 3 ebaõnnestunud PCR proov. Paljundatava DNA oodatav pikkus on 1675ap (rada 2, 4). Kasutatud on 1%-list agarosgeeli ning DNA visualiseerimiseks UV valguses on kasutatud EtBr-i.

2.3.1.1 KanMX geeni genoomi rekombineerumise kontroll

PCR-i abil amplifitseeritud KanMX geen koos Fkh2 lookusega homologsete järjestustega transformeeriti *wild-type* (WT) (AKY2344) pärmütüvesse.

G418 selektiivsöötme tassidel üles kasvanud kolooniatest valiti välja kolm kolooniat, millest eraldati genoomne DNA ning viidi läbi PCR, et teha kindlaks, kas KanMX geen on homologse rekombinatsiooni käigus sisestunud oodatud asukohta ning vahetanud välja Fkh2 geeni.

KanMX fragmendi inkorporeerumist genoomi kontrolliti FKH2_KO_CTRL ja FBA1_ctrl_2 praimeritega. FKH2_KO_CTRL praimer seondub pärmis genoomis Fkh2 geeni alguskoodonist 500 ap ülespoole ning FBA1_ctrl_2 praimer seondub PCR-il sünteesitud KanMX fragmendi peale (Joonis 6). Kui KanMX geeni genoomi rekombineerumine on õnnestunud, on UV-pildil näha signaali 522 ap juures (Joonis 8 rada 2,3). Järgenvateks katseteks kasvatati üles pärmikoloonia C2, mille kontroll-PCR-i tulemus on joonisel 8 rajal 3.



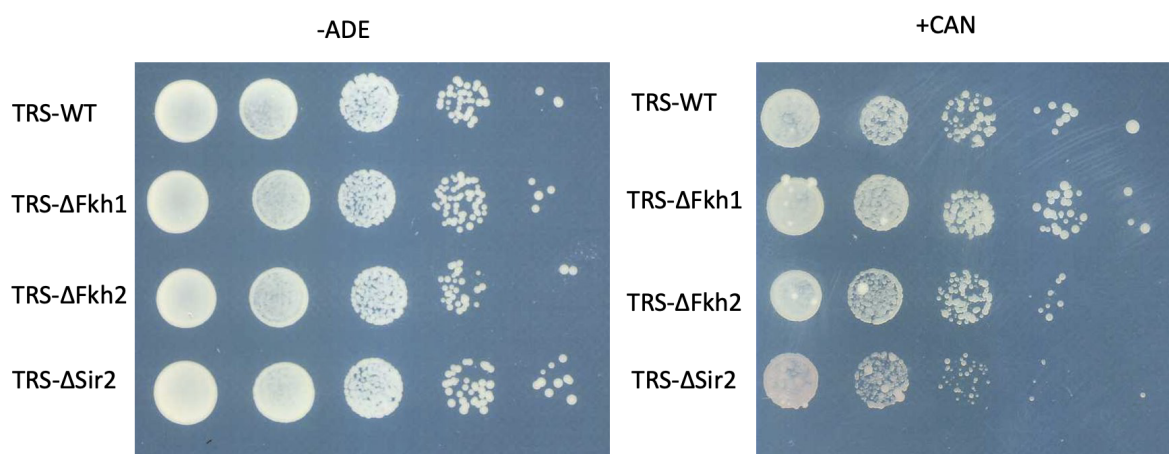
Joonis 8. KanMX geeni inkorporatsiooni kontroll Fkh2 lookusesse PCR-meetodil. Rajal 1 on DNA -suurusmarker (250 - 10 000 ap), rajal 2-4 on KanMX geeni olemasolu kontrolliks valitud kolooniate PCR-i tulemused. Kasutatud on 1%-list agarosgeeli ning DNA visualiseerimiseks UV-valguses on lisatud geelile EtBr-i.

2.3.2 Lahjenduste rea analüüs

Lahjenduste rea analüüs võimaldab võrrelda erinevate pärmitüvede kasvuvõimekust erinevatel tingimustel. Järgnevalt on toodud alapunktadena katse tulemused vaigistamispiirkondade lõikes.

2.3.2.1 Fkh1 valk pärsib rDNA vaigistamist.

+CAN tassil võrreldi pärmitüvede (TRS-WT, TRS- Δ Fkh1, TRS- Δ Fkh2, ja TRS Δ Sir2) kasvu, et teada saada vaigistatuse tasemest rDNA piirkonnas. Kui pärmitüvi tassil kasvas, siis vaigistamine antud piirkonnas töötas, vastasel juhul mitte. Kontrolltassil (Joonis 9, -ADE) on näha kõigi nelja pärmitüve ühtse kiirusega kasvu. +CAN tassil (Joonis 9, +CAN) on näha kõigi uuritud tüvede puhul aeglasemat kasvu kõigis lahjendustes võrreldes kontrolltassiga. Omavahel on võrreldavad TRS-WT ja TRS- Δ Fkh2 tüvede kasv, seevastu TRS- Δ Fkh1 tüvi kasvab paremini kui nii TRS-WT kui ka TRS- Δ Fkh2 tüvi. Kontrolltüvena kasutatud TRS- Δ Sir2 kasvas oluliselt aeglasemalt kui TRS-WT ning mõlemad, TRS- Δ Fkh1 ja TRS- Δ Fkh2 tüved. +CAN tassil on märgata TRS- Δ Fkh1, TRS- Δ Fkh2, ja TRS- Δ Sir2 tüvedes üksikute kolooniate kiiremat kasvu (ühes lahjendusrea täpis nähtav suurema diameetriga koloonia).



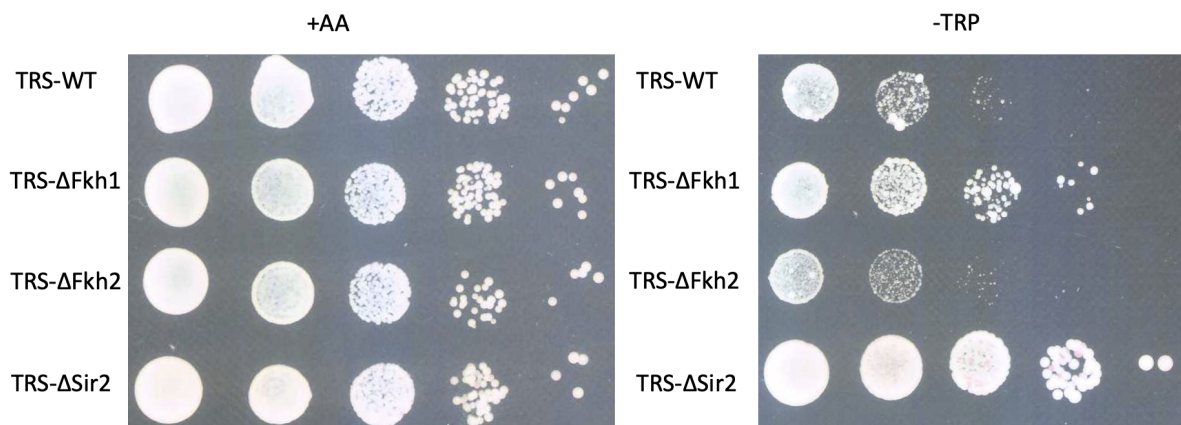
Joonis 9. Vaigistamise hindamine rDNA lookuses. Vasakul on näha -ADE kontrolltassi ning paremal +CAN (L-kanavaniin) selektiivsöötmege tassi lahjenduskülvi tulemustega. Vertikaalselt (pärimtüved loetletuna ülevalt alla) TRS-WT-metsiktüüpi *triple silencer* tüvi, TRS- Δ Fkh1- *triple silencer* tüvi, millest on eemaldatud Fkh1 valk, TRS- Δ Fkh2- *triple silencer* tüvi, millest on eemaldatud Fkh2 valk, TRS- Δ Sir2- kontrolltüvi, millest on

eemaldatud Sir2 valk. Kontrolltass kasvas 30°C juures 3 ööpäeva, +CAN oli selektiivsöötme tassidest kõige aeglasema kasvuga, kasvades 5 ööpäeva.

2.3.2.2 Fkh1 valk soodustab HMR lookuse vaigistamist

-TRP tassil võrreldi pärmitüvede (TRS-WT, TRS- Δ Fkh1, TRS- Δ Fkh2, ja TRS- Δ Sir2) kasvu, et teada saada vaigistamisest HMR lookuses. Kui -TRP tassil kasv esines, siis vaigistamist ei toimunud, sest TRS (*triple silencer*) tüves olevat TRP1 markergeeni ekspresseeriti, vastasel korral oleks geen vaigistatud ja kasvu poleks.

Pagaripärmis on HMR/L tavaolukorras vaigistatud. Kontrolltassil (Joonis 10, +AA) on näha kõigi pärmitüvede intensiivset kasvu igas lahjendusastmes. -TRP tassil (Joonis 10, -TRP) on parim kasv kontrolltüvel (TRS- Δ Sir2), mis on sama intensiivsusega kontrolltassil nähtavaga. TRS- WT kasv -TRP tassil on sarnane TRS- Δ Fkh2 kasvuga, mõlemate tüvede kasv oli üksteisega võrreldav kõigi rakulahjenduste puhul. Erinevus nende vahel seisnes TRS- WT-i teise lahjendustäpi mõningate kolooniate intensiivsemas kasvus. TRS- Δ Fkh1 tüve kasv oli intensiivne, kuid aeglasem kui TRS- Δ Sir2 tüve puhul. Viiendas lahjendustäpis rakkude kasv puudus. Ka -TRP tassil on märgata TRS- WT, TRS- Δ Fkh1, ja TRS- Δ Fkh2 tüvedes üksikute kolooniate kiiremat kasvu (ühes lahjendusrea täpis nähtav suurema diameetriga koloonia).

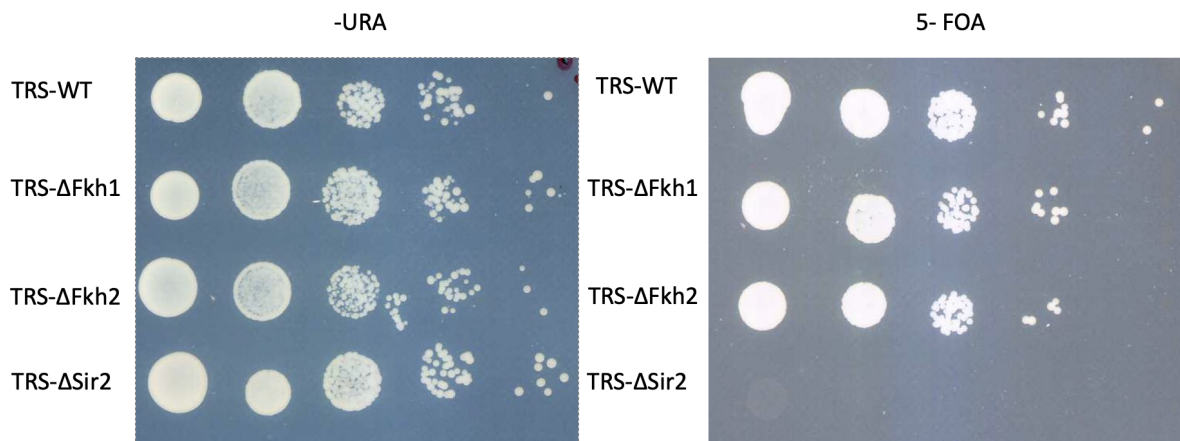


Joonis 10. Vaigistamise hindamine HMR/L lookuses. Vasakul on näha +AA kontrolltassi ning paremal -TRP selektiivsöötme tassi. Vertikaalselt (pärmitüved loetletuna ülevalt alla) TRS-WT-metsiktüüpi *triple silencer* tüvi, TRS- Δ Fkh1- *triple silencer* tüvi, millest on eemaldatud Fkh1 valk, TRS- Δ Fkh2- *triple silencer* tüvi, millest on eemaldatud Fkh2 valk,

TRS- Δ Sir2- kontrolltüvi, millest on eemaldatud Sir2 valk. Kontrolltass kasvas 30°C juures 3 ööpäeva, -TRP selektiivsöötme tass kasvas 4 ööpäeva.

2.3.2.3 Fkh1 ja Fkh2 valgud ei mõjuta telomeeri vaigistamist.

5-FOA tassil võrreldi pärmitüvede (WT, Δ Fkh1, Δ Fkh2, ja Δ Sir2) kasvu, et teada saada vaigistamisest telomeersel alal. Pärmirakkude kasvu esinemisel vaigistamine töötas, sest URA3 markerit ei ekspresseeritud. See on TRS tüves TEL lookuses asuv markergeen, vaigistamise detekteerimiseks. Kontrolltassil (Joonis 11, -URA) esines intensiivne kasv kõigi tüvede rakkudel. 5-FOA tassil (Joonis 11, 5-FOA) oli märgata õrna kasvueelset TRS-WT tüvel. TRS- Δ Fkh1 ja TRS- Δ Fkh2 puhul oli kasv sarnane (mõlemal neljanda lahjendustäpini).



Joonis 11. Vaigistamise hindamine telomeersel alal. Vasakul on näha -URA kontrolltassi ning paremal -FOA selektiivsöötmega tassi. Vertikaalselt (pärmitüved loetletuna ülevalt alla) TRS- WT-metsiktüüpi *triple silencer* tüvi, TRS- Δ Fkh1- *triple silencer* tüvi, millest on eemaldatud Fkh1 valk, TRS- Δ Fkh2- *triple silencer* tüvi, millest on eemaldatud Fkh2 valk, TRS- Δ Sir2- kontrolltüvi, millest on eemaldatud Sir2 valk. Kontrolltass kasvas 30°C juures 3 ööpäeva, 5-FOA tassil kasvasid rakud 4 ööpäeva.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli teha kindlaks, kas ja kui suur on pagaripärmi *forkhead*-transkriptsioonifaktorite perekonda kuuluvate Fhk1 ja Fhk2 valkude roll pärmi kolme heterokromatiinse piirkonna vaigistamisel.

Selle teadasaamiseks kasutati nn kolmikmarker (*triple silencer, TRS*) tüve, kus igasse pärmis vaigistatavasse piirkonda on viidud erinev markergeen, mille ekspressiooni/vaigistamise järgi on võimalik kindlaks teha, kas piirond on vaigistatud või mitte. Sellesse mudelsüsteemi lisati eraldi Fhk1 ja Fhk2 deletsioonid ning võrreldi erinevate pärmitüvede kasvukiirust vaigistamise efektiivsust näitavatel selektiivsöötmetel.

Fkh1 ja Fkh2 deletsiooniga katsed näitasid, et vaigistamine erines piirkonniti. Varasem avaldatud katse Fkh1 deletsioonitüvega (Hollenhorst 2000) kinnitas selle valgu olulisusest HMR lookuse vaigistamisel. Nii ka käesolev töö (Joonis 10). Antud katses eeldasime, et kui vaigistamine on häiritud, peaks rakud kasvama paremini tänu sellele, et on võimalik rakkudele eluks tähtsa aminohappe, trüptofaani, sünteesiks vajaliku ensüümi (TRP1) pidev transkriptsioon. Võrreldes kontrolltüvega (TRS- Δ Sir2), kus vaigistamist ei saa toimuda ning rakkude kasv oli kiire, kasvasid Fkh1 deletsiooniga rakud veidi aeglasemalt, viidates sellele, et Fkh1 küll soodustab HMR lookuse vaigistamist, kuid pole selleks hädavajalik.

Seevastu Fkh2 deletsioon HMR lookuse vaigistamisele mõju ei avaldanud- rakud kasvasid TRS-WT-ga sama intensiivsusega.

Samas on katsest metsik-tüüpi (ning ka TRS- Δ Fkh2) tüvega näha, et HMR lookus pole selles tüves täielikult vaigistatud, kuna rakud on siiski võimelised kasvama -TRP söötmel, st mingil määral toimub ka neis rakkudes trüptofaani süntees. Arvatavasti leiab neis rakkudes aset heterokromatiini aeg-ajaline dünaamiline avanemine ja sulgemine tänu survele toota raku ellujäämiseks vajalikku valku, kui selle geen on genoomis olemas. Mõnedes pärmikolooniates seda protsessi tõenäoliselt ei toimunud, kuid mõned rakud olid selles edukamad ning suudavad seeläbi ka kasvada. Võrreldes teiste markergeenidega võimaldab

TRP1 kasutamine sellisel protsessil juhtuda - teiste markergeenide puhul on geeniproducti ekspressiooni korral tulemuseks rakkudele toksiliste komponentide kuhjumine ning rakkude kiire surm.

Uurimaks telomeerse ala vaigistamist ilmnas, et Fkh1 ja Fkh2 pole vaigistamiseks vajalikud (Joonis 11), sest erinevad pärmitüved suutsid kasvada 5-FOA selektiivsöötmele TRS-WT-ga võrreldava kiirusega. Mudelsüsteemi tööd kinnitas TRS- Δ Sir2 kasvu puudumine 5-FOA selektiivsöötme tassilt.

rDNA lookuse puhul ilmnas, et Fkh1 deletsiooniga rakud kasvasid kanavaniiniga söötmele paremini kui metsik-tüüpi ja Δ Fkh2 rakud (Joonis 9). Seega võib arvata, et tavatingimustes Fkh1 pigem takistab rDNA lookuse vaigistamist, Fkh2-l aga vaigistamisele mõju pole. On näidatud, et nii Fkh1 kui ka Fkh2 seonduvad Sir2 valguga ning mõjutavad viimase tuumasisest lokalisatsiooni (Linke 2013). See võib olla üks potentsiaalseid teid, läbi mille Fkh1 rDNA lookuse (vaigistamiseks on vajalik vaid Sir2 deatsetülaas), vaigistamist mõjutab.

Sarnaselt HMR-lookusega, kus oleksime oodanud, et WT rakud kasvavad selektiivtassil (-TRP) väga halvasti või üldse mitte, nägime kanavaniini selektsioonitassil, et kontrolltüve TRS- Δ Sir2 rakud pole kõik surnud nagu oleks eeldatav tulemus. CAN1 geeni produkt, mida rDNA lookuses markerina kasutati, funktsioneerib kui arginiini rakku transportija. Kui see geen on rakkudes deleteeritud, võtavad tema ülesande üle teised valgud ning rakud saavad arginiini tarbida. Kui CAN1 geen aga funktsioneerib, tuuakse rakkudesse keskkonnast ka kanavaniini (arginiini analoog), mille inkorporatsioon valkudesse translatsiooni käigus muudab valgud mitte-funktsionaalseks ning seega põhustab rakkude surma. TRS- Δ Sir2 tüves oleksime oodanud just sellist tulemust, kuid oli näha, et ka TRS- Δ Sir2 rakud siiski kasvavad. Mudelsüsteemi parendamiseks oleks siinkohal hea katset läbi viia erinevate, kõrgemate kanavaniini kontsentratsioonidega, et saavutada vaigistatuse puudumise selge mõju kontrolltüvele.

Lisaks eelnevale oli märgata pärmikolooniade lahjendusrea täppidel intensiivsemat kasvu +CAN (TRS- Δ Fkh1, TRS- Δ Fkh2, TRS- Δ Sir2) ja -TRP (TRS- Δ Fkh1, TRS Δ Fkh2, TRS-WT) tassil - ühes lahjendusrea täpis nähtav suurema diameetriga koloonia. Võib arvata, et deletsioonitüvede kontekstis võis mõnedes rakkudes toimuda näiteks spontaanseid

mutatsioone, mis muutsid muidu funktsionaalse CAN1 markergeeni mittefunktsionaalseks, tagades selle, et üksikud rakud olid võimelised väga hästi kasvama ka juhul, kui rDNA lookuses vaigistamine kadus ning CAN1 geeni transkribeeriti. TRP1 transkribeerimine on trüptofaani tootmiseks hädavajalik. Ehk puudus mõningatel -TRP söötmel kasvanud pärmikolooniatel vaigistamiskompleksi moodustumine ning need kolooniad kasvasid teistest kiiremini, ülejäänutel võttis TRP1 avaldumine kauem aega.

Erinevus kahe selektiivsöötme tassi vahel seisnes WT ühtlases kasvus +CAN tassil. Ehk on siin TRS- WT-s aktiivsemad mehhanismid, mis hoiavad ära mutantide teket kui kõigis eelpool nimetatud deletsioonimutantides.

Projekti järgmistes etappides oleks vajalik kõigi funktsionaalsete katsete kordamine ning mudelsüsteemi optimeerimine. Lisaks, vaigistamise esinemise või puudumise kindlaks tegemine ka erinevates vaigistatavates piirkondades olevate geenide transkriptsiooni ehk mRNA tasemel. Selleks võiks kasutada kvantitatiivse PCR-i meetodit.

Kuigi kasutatud mudelsüsteem oli väga kasutajasõbralik ja mugav - võimalus uurida ühes ja sams pärmitüves korraga kõiki kolme vaigustatavat piirkonda - ilmnes, et see pole optimaalne tänu markergeenide selektsioonipõhimõtete erinevustele. Selle probleemi lahendamiseks võiks konstrueerida eraldiseisvad pärmitüved, kus kõigis erinevates vaigistatavates piirkondades kasutatakse ühte ja sama markergeeni, näiteks URA3 geeni ning 5-FOA selektsiooni. See tähendaks küll konstrueeritavate pärmitüvede hulga kolmekordistumist, kuid lihtsustaks ja ühtlustaks katsetulemuste interpretatsiooni.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab FKH1 või FKH2 geeni deleteerimine heterokromatiini moodustamist pagaripärmis.

Et jõuda seatud eesmärgini, kasutati pärmitüve, kus pagaripärmis vaigistatavatesse piirkondadesse (HMR/L, rDNA ja telomeer) olid viidud markergeenid, mille avaldumise järgi oli võimalik hinnata vaigistamise efektiivsust. Põhinedes sellel tüvel konstrueeriti uued tüved, milledes Fkh1 ning Fkh2 transkriptsioonifaktorid olid deleteeritud. Tulemusteni jõuti võrreldes tüvede kasvukiirusi selektiivsöötmetel.

Varasema uuringute (Hollenhorst 2000) kinnituseks näidati ka käesolevas töös, et Fkh1-l on mõju HMR lookuse vaigistamisele ehk kui valk deleteerida on vaigistamine vähem efektiivne. Seevastu Fkh2-e deletsioon ei avaldanud HMR lookuse vaigistamisele mõju. rDNA piirkonna tulemustest võib järeldada, et Fkh1 pigem pärsib rDNA vaigistamist. Fkh2 ja WT olid sarnase kasvukiirusega, mis tähendab et Fkh2-l rDNA-s vaigistamisele mõju pole. Telomeersedel alade vaigistamisel Fkh1 ja Fkh2 rolli ei detekteeritud.

SUMMARY

The role of transcription factors Fkh1 and Fkh2 in gene silencing in *S. cerevisiae*

Merilin Rääk

In eukaryotic cell, the DNA is packed in a higher order structure called chromatin. This structure can be in hetero- or euchromatin form. Heterochromatin means a transcriptionally inactive state, where there is no gene expression. In budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* there are 3 silenced regions: telomeres, HMR/L loci and rDNA. Here the silencing complex is formed, which consists of Sir proteins and helper proteins that help to stabilize the Sir complex and guide them to the right silencing region.

Previously it has been shown that transcription factors Fkh1 and Fkh2 are involved in HMR locussilencing (Hollenhorst 2000). The aim of this study was to assess the effect of Fkh1 and Fkh2 proteins on silencing in budding yeast. For that a yeast strain carrying different marker genes in all three silenced regions was used (triple silencer strain). In addition, the strain was modified by deleting either FKH1 or FKH2 genes. Growth of deletion strains on selective media was evaluated using spot test assay. Our study confirmed that Fkh1 has an effect on silencing in HMR locus, However, Fkh2 deletion had no impact on gene silencing in HMR locus. In rDNA region Fkh1 seems to have a mild inhibitory effect on DNA silencing. Fkh1 and Fkh2 are not important in telomeric silencing.

KIRJANDUSE LOETELU

- Aref, R., Sanad, M. N. M. E., & Schüller, H.-J. (2021). Forkhead transcription factor Fkh1: Insights into functional regulatory domains crucial for recruitment of Sin3 histone deacetylase complex. *Current Genetics*, 67(3), 487–499.
- Bi, X., Heterochromatin structure: lessons from the budding yeast. (2014). *IUBMB Life*, 66(10), 657-66.
- Biswas, M., Maqani, N., Rai, R., Kumaran, S. P., Iyer, K. R., et al. (2009). Limiting the extent of the *RDNI* heterochromatin domain by a silencing barrier and Sir2 protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*, 29, 2889–2898.
- Buck, S. W., Sandmeier J. J. & Smith J. S. (2002). RNA polymerase I propagates unidirectional spreading of rDNA silent chromatin. *Cell*, 111, 1003–1014.
- Caridi, P. C., Delabaere, L., Zapotoczny, G., & Chiolo, I. (2017). And yet, it moves: Nuclear and chromatin dynamics of a heterochromatic double-strand break. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1731), 20160291.
- de Jonge, W. J., Brok, M., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., & Holstege, F. C. (2020). Genome-wide off-rates reveal how DNA binding dynamics shape transcription factor function. *Molecular Systems Biology*, 16(10).
- Chen, H., Xue, J., Churikov, D., Hass, E. P., Shi, S., Lemon, L. D., Luciano, P., Bertuch, A. A., Zappulla, D. C., Géli, V., Wu, J., & Lei, M. (2018). Structural Insights into Yeast Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell*, 172(1–2), 331-343.e13.
- Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197(1), 33–48.
- Flint, J. (1997). Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1305–1313.

- Gartenberg, M. R., & Smith, J. S. (2016). The Nuts and Bolts of Transcriptionally Silent Chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203(4), 1563–1599.
- Giaimo, B. D., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S. B., & Borggrefe, T. (2019). The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1), 37.
- Granneman, S. & Baserga, S. J. (2005). Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol*, 17, 281–286.
- Grewal, S. I., & Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet*, 8, 35–46.
- Haber, J E., Lee, C-S. (2012). Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr*, 3(2), MDNA3-0013-2014.
- Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. *Genetics*, 189(3), 705–736.
- He, C., Zhou, C., & Kennedy, B. K. (2018). The yeast replicative aging model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(9), 2690–2696.
- Hollenhorst, P. C., Bose, M. E., Mielke, M. R., Müller, U., & Fox, C. A. (2000). Forkhead Genes in Transcriptional Silencing, Cell Morphology and the Cell Cycle: Overlapping and Distinct Functions for FKH1 and FKH2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154(4), 1533–1548.
- Ide, S., Saka, K., & Kobayashi, T. (2013). Rtt109 Prevents Hyper-Amplification of Ribosomal RNA Genes through Histone Modification in Budding Yeast. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003410.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L.(2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.
- Jin, Y., Liang, Z., & Lou, H. (2020). The Emerging Roles of Fox Family Transcription Factors in Chromosome Replication, Organization, and Genome Stability. *Cells*, 9(1), 258.
- King, G. A., Goodman, J. S., Schick, J. G., Chetlapalli, K., Jorgens, D. M., McDonald, K. L., & Ünal, E. (2019). Meiotic cellular rejuvenation is coupled to nuclear remodeling in budding yeast. *ELife*, 8, e47156.

- Knott, S. R. V., Peace, J. M., Ostrow, A. Z., Gan, Y., Rex, A. E., Viggiani, C. J., Tavaré, S., & Aparicio, O. M. (2012). Forkhead Transcription Factors Establish Origin Timing and Long-Range Clustering in *S. cerevisiae*. *Cell*, *148*(1–2), 99–111.
- Krebs, J. E. (2007). Moving marks: Dynamic histone modifications in yeast. *Molecular BioSystems*, *3*(9), 590.
- Kupiec, M. (2014). Biology of telomeres: Lessons from budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(2), 144–171.
- Kyriss, M. N. M., Jin, Y., Gallegos, I. J., Sanford, J. A., & Wyrick, J. J. (2010). Novel Functional Residues in the Core Domain of Histone H2B Regulate Yeast Gene Expression and Silencing and Affect the Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(14), 3503–3518.
- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*, *32*(1), 42–56.
- Liang, F., Lu, L., Li, Y.,... He, F. (2017). Functional constraints on adaptive evolution of protein ubiquitination sites. *Scientific Reports*, *7*(1), 39949.
- Linke, C., Klipp, E., Lehrach, H., Barberis, M., & Krobitch, S. (2013). Fkh1 and Fkh2 associate with Sir2 to control CLB2 transcription under normal and oxidative stress conditions. *Frontiers in Physiology*, *4*.
- Luger, Karolin & Dechassa, Mekonnen & Tremethick, David. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: An ordered state or a disordered affair?. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *13*, 436-47.
- Madhani, H. D. (2005). From a to α : Yeast as a Model for Cellular Differentiation. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, *15*,122.
- Mariño-Ramírez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A., & Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Review of Proteomics*, *2*(5), 719–729.
- McGinty, R. K., & Tan, S. (2015). Nucleosome Structure and Function. *Chemical Reviews*, *115*(6), 2255–2273.
- Minchell, N. E., Keszthelyi, A. & Baxter, J. (2020). Cohesin Causes Replicative DNA Damage by Trapping DNA Topological Stress. *Mol Cell*, *78*(4), 739-751.

- Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., & Murakami-Tonami, Y. (2010). Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell Cycle*, 9(16), 3253–3262.
- Ostrow, A. Z., Nellimoottil, T., Knott, S. R. V., Fox, C. A., Tavaré, S., & Aparicio, O. M. (2014). Fkh1 and Fkh2 Bind Multiple Chromosomal Elements in the *S. cerevisiae* Genome with Distinct Specificities and Cell Cycle Dynamics. *PLoS ONE*, 9(2), e87647.
- Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 410–414.
- Phillips, DM. (1963). The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J*, 87, 258–63.
- Pinto, I. (2000). Histone H2A is required for normal centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19(7), 1598–1612.
- Rando, O. J., & Winston, F. (2012). Chromatin and Transcription in Yeast. *Genetics*, 190(2), 351–387.
- Ray, A., Hector, R. E., Roy, N., Song, J.-H., Berkner, K. L., & Runge, K. W. (2003). Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nature Genetics*, 33(4), 522–526.
- Rine, J. (1989). The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in *Molecular and Cellular Biology: A Smaller but not Lower Eucaryote*. *AMER. ZOOL*, 29, 605-616.
- Sherman, F. (2002). Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol*, 350, 3-41.
- Shi, B.-J. (2016). Decoding common and divergent cellular functions of the domains of forkhead transcription factors Fkh1 and Fkh2. *Biochemical Journal*, 473(21), 3855–3869.
- Shogren-Knaak, M., Davie, C. L., Peterson, Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J. & James R. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 10, 311(5762):844-7.
- Sinclair, D. A., Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell*, 91, 1033–1042.
- Smith, J. S., Caputo, E., & Boeke, J. D. (1999). A Genetic Screen for Ribosomal

- DNA Silencing Defects Identifies Multiple DNA Replication and Chromatin-Modulating Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 3184–3197.
- Sperling, A. S., & Grunstein, M. (2009). Histone H3 N-terminus regulates higher order structure of yeast heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13153–13159.
- Uckelmann, M., & Sixma, T. K. (2017). Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair*, 56, 92–101.
- Wang, X., Bryant, G., Zhao, A., & Ptashne, M. (2015). Nucleosome Avidities and Transcriptional Silencing in Yeast. *Current Biology*, 25(9), 1215–1220.
- Wellinger, R. J., & Zakian, V. A. (2012). Everything You Ever Wanted to Know About *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres: Beginning to End. *Genetics*, 191(4), 1073–1105.
- Woodcock, C L. & Rajarshi, P. G. (2010). Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000596.
- Zaman, S., Choudhury, M., Jiang, J. C., Srivastava, P., Mohanty, B. K., Danielson, C., Humphrey, S. J., Jazwinski, S. M., & Bastia, D. (2016). Mechanism of Regulation of Intrachromatid Recombination and Long-Range Chromosome Interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 36(10), 1451–1463.
- Zukowski, A., & Johnson, A. M. (2018). The interplay of histone H2B ubiquitination with budding and fission yeast heterochromatin. *Current Genetics*, 64(4), 799–806.

LISAD

Lisa 1

Järgnevas tabelis (Tabel 1) on välja toodud kõik antud töös kasutatud söötmed koos nende koostise ja kasutamise eesmärkidega.

Tabel 1. Kasutatud söötmete koostis ja kasutamise eesmärk

Sööde	Koostis	Kasutusala
YPD (yeast extract, peptone, dextrose)	Vedelsööde: Mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos 20g/l. Tardsöötme puhul lisati agar-agarit (20 g/l)	Pärmirakkude kasvatamine
5- FOA	5-FOA 0,5mg/ml, YNB 6,7 g/l, agar 4%, glükoos 20 g/l, lämmastikalused ja aminohapped -lüsiin 80 µg/ml, trüptofaan 80 µg/ml, uratsiil 200 µg/ml, adeniin 200 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml	Kontrollimaks vaigistamise toimumist telomeersel alal. Kui URA3 geeni ei ekspresseerita-vaigistamine töötab, rakud kasvad selektiivsöötmel
-URA	YNB 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 20 g/l, lämmastikalused ja aminohapped -lüsiin 80 µg/ml, trüptofaan 80 µg/ml, adeniin 200 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml	Kontrollimaks <i>S.cerevisiae</i> kasvu söötmel, kontrolltass

SC -TRP	YNB 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 20 g/l, lämmastikalused ja aminohapped -lüsiin 80 µg/ml, adeniin 200 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml, uratsiil 200 µg/ml	Kontrollimaks vaigistamise toimumist paardumistüüpi määravas lookuses (HMR). Kui TRP1 geeni ei ekspresseerita - vaigistamine töötab, rakud ei kasva selektiivsöötmele
+AA	YNB 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 20 g/l, lämmastikalused ja aminohapped -lüsiin 80 µg/ml, adeniin 200 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml, trüptofaan 80 µg/ml, uratsiil 200 µg/ml	Kontrollimaks <i>S.cerevisiae</i> kasvu söötmele, kontrolltass
+CAN	L-kanavaniin (CAN) 64 µg/ml, YNB 6,7 g/l, agar 2% +AA [lüsiin 80 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml, trüptofaan 80 µg/ml, uratsiil 200 µg/ml], glükoos 20 g/l	Kontrollimaks vaigistamise toimumist rDNA-s. Kui CAN1 geeni ei ekspresseerita - vaigistamine töötab, rakud kasvavad selektiivsöötmele
-ADE	YNB 6,7 g/l, agar 2% +AA (+AA - agar sisaldab kõiki 6 aminohapet)[lüsiin 80 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml, trüptofaan 80 µg/ml, uratsiil 200 µg/ml], glükoos 20 g/l	Kontrollimaks <i>S.cerevisiae</i> kasvu söötmele, kontrolltass
G-418	G-418 100 mg/µl, YNB 6,7 g/l, agar 2% +AA (+AA - agar sisaldab 6 aminohapet)[lüsiin 80 µg/ml, adeniin 200 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml,	Kontrollimaks <i>S.cerevisiae</i> transformatsioonijärgset kasvu selektiivsöötmele ehk söötmele kasvavad need kolooniad, milles on KanMX markergeen

	trüptofaan 80 µg/ml, uratsiil 200 µg/ml], glükoos 20 g/l	
--	---	--

Lisa 2

Järgnevas tabelis (Tabel 2) on välja toodud PCR reaktsioonide läbiviimiseks kasutatud praimerid.

Tabel 2. PCR praimerite järjestused ja kasutamise eesmärgid

Praimeri nimetus	Järjestus	Milleks kasutati
FBA1_CTRL_2	5'- CGAACTCCAAAATGAGCTATC-3'	Kontrolliks, kas markergeen (KanMX) on asendanud genoomis Fkh2-e
FKH2_KO_CTRL	5'-GATGGCCTCTTCTTCCTGTC... 3'	Kontrolliks, kas markergeen(KanMX) on asendanud genoomis Fkh2-e
FKH2-KO-5'	5' CTTTATTGAAACTTTATCAATGCG CAAGAAATGTCCAGCAGCAATTT TAA GATAGCTCATTTTGGAGTTCG 3'	KanMX geeni ja FKH2 promootorala (30bp enne ja 20 bp peale ATG-d) süntees
FKH2 -3x TAG_R	TAG_R (järjestus praimerit tuubilt!) 5'- CCATTTCTCATTTCATTTCTTTAGTC	KanMX geeni ja FKH2 terminaatorala süntees (50 bp pärast stop-koodonit)

	TTAGTGATTCACCTTGTTTCTTGT C CAGGAAACAGCTATGACCATG-3'	
--	---	--

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada Arnold Kristjuhanit, tänu kellele ma Kromatiini uurimisgrupiga sain liituda. Soovin tänada ka oma juhendajat Signe Värvi toetuse, kannatlikkuse ja hea juhendamise eest. Viimaks tänan kõiki laborikaaslasid ja teisi Rakubioloogia ja teiste õppetoolide teadlasi. Te teate oma valdkonda ja suhtute uutesse tulijatesse abivalmilt ja toetavalt. Aitäh teile!

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merilin Rääk (sünnikuupäev 19.02.1996),
annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“Transkriptsioonifaktorite *forkhead 1* (Fkh1) ja *forkhead 2* (Fkh2) roll vaigistamisel *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes”,

mille juhendaja on Signe Värvi,

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

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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

Merilin Rääk, 11.08.2021

