

*Saccharomyces cerevisiae*에서 telomeric silencing 조절자를 찾기 위한 마커 유전자 탐색

오준수[†] · 김세호[†] · 김동현 · 이정신*^{ID}

강원대학교 분자생명과학과

Searching for marker genes to identify the telomeric silencing regulators in *Saccharomyces cerevisiae*

Junsoo Oh[†], Seho Kim[†], Donghyun Kim, and Jung-Shin Lee*^{ID}

Department of Molecular Bioscience, College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received November 7, 2022; Revised November 25, 2022; Accepted November 25, 2022)

Telomeres in most eukaryotes are composed of heterochromatin structure. Genes adjacent to the telomeres undergo the telomere position effect (TPE) due to the spreading of telomeric heterochromatin. *Saccharomyces cerevisiae* is a good model organism for the study of heterochromatin and TPE. In particular, a yeast strain at which a uracil biosynthetic gene (*URA3*) is inserted in the subtelomere of *ChrVII-L* has been widely used as for a screening tool for TPE regulators. However, there is much inconvenience because a lot of time and labor are required for construction of yeast strains and further validation of reporter assay results. In this study, we introduce at least six marker genes definitely undergoing transcriptional silencing by TPE. We expect that qRT-PCR analyses targeting our subtelomere marker genes will clarify whether some potential TPE regulators are really modulating the subtelomeric gene silencing.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, marker gene, telomere position effect, telomeric silencing

진핵생물들에서 centromere, telomere 등으로 대표되는 heterochromatin 구조는 recombination이 되지 않도록 특별한 수준의 보호가 필요한 DNA 서열들에 주로 형성되어 있다(Grewal

and Jia, 2007; Kueng *et al.*, 2013). Heterochromatin 구조들은 고도로 응축된 구조이기 때문에 그 근처에 유전자들이 있다면 transcription factor 등의 접근이 제한되고 발현이 거의 되지 않는 position effect를 받게 된다(Grewal and Jia, 2007; Kueng *et al.*, 2013). Position effect variegation (PEV)는 특히 *Drosophila*에서 가장 많이 연구되어 왔으며 후성유전학(epigenetics) 연구의 중요한 model 중 하나로 사용되었다(Grewal and Jia, 2007; Kueng *et al.*, 2013). 실제로 후에 H3K9 methyltransferase로 알려지게 될 SuVar(3-9)를 비롯한 150여 개의 chromatin 조절 단백질들이 *Drosophila*에서 PEV의 suppressor 혹은 enhancer를 찾는 screening을 통해 밝혀졌다(Reuter and Wolff, 1981; Schotta *et al.*, 2002).

*Saccharomyces cerevisiae*는 heterochromatin 연구의 좋은 모델 생물체이며 telomere는 대표적인 heterochromatin 지역이다(Kueng *et al.*, 2013). *Saccharomyces cerevisiae*의 telomere position effect (TPE)는 Sir complex (Sir2, Sir3, Sir4)에 의해 형성되는 telomeric heterochromatin에 의해 나타난다(Kueng *et al.*, 2013; Bi, 2014; Oh *et al.*, 2022). Telomere 근처의 여러 nucleation site들에서 Sir complex의 조립이 시작되고, Sir complex는 telomere에서 먼 쪽 방향으로 퍼져나간다(Hoppe *et al.*, 2002; Rudner *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2009). Telomere로부터의 거리가 멀어질수록 Sir complex의 spreading 강도가 약해지며, telomere 근처에 있는 유전자들(subtelomeric gene)

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: jungshinlee@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8540; Fax: +82-33-259-5641

은 TPE를 받아서 gene silencing을 겪는다(Gottschling *et al.*, 1990; Kueng *et al.*, 2013; Bi, 2014; Oh *et al.*, 2022).

*Saccharomyces cerevisiae*에서 간단한 growth assay를 통해 TPE의 조절자들을 찾는 방법이 고안되었다(Gottschling *et al.*, 1990). 5-FOA는 uracil 생합성에 중요한 *URA3* 유전자의 산물에 의해 독성물질로 전환되기 때문에 *URA3*의 발현이 억제된 균주만 5-FOA (Fluoroorotic acid) 배지에서 살 수 있다(Boeke *et al.*, 1987). *ChrVII-L*의 telomere에 위치한 *ADH4* 유전자 promoter 뒤에 *URA3* ORF를 삽입시킨 yeast 균주는 TPE에 의해 *URA3*의 대사산물이 충분히 발현되지 못해서 5-FOA 배지에서 살 수 없다(Gottschling *et al.*, 1990). 하지만 telomeric silencing의 조절자들의 돌연변이 주에서는 *URA3*의 발현이 억제되지 못하기 때문에 이 배지에서 살 수 없다(Gottschling *et al.*, 1990). 이 방법을 이용해서 N-terminal acetyltransferase A (NatA)의 Ard1, H3K79 methylase Dot1, H3K4 methylase Set1, H2BK123 ubiquitinase Rad6 등 다양한 telomeric silencing 조절단백질들을 발견할 수 있었다(Aparicio *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1997; Nislow *et al.*, 1997; Singer *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2001; Krogan *et al.*, 2002).

하지만 이 growth assay를 통해 telomeric silencing의 조절자를 찾는 방법에는 번거로움과 한계가 있다. 첫번째로는, *ChrVII-L-URA3* reporter가 있는 wildtype 균주에서 telomeric silencing의 조절자로 의심되는 유전자들을 knockout 시킨 균주를 새롭게 제작해야하는 번거로움이 있다(Gottschling *et al.*, 1990). 또한, *URA3*는 본래 locus가 아니라 인위적으로 *ChrVII-L*에 삽입 되었기 때문에 telomeric silencing의 조절자로 의심되는 유전자가 자연적인 telomere locus의 silencing을 조절하는지 추가적인 실험이 필요하다(Gottschling *et al.*, 1990). 마지막으로, *URA3* 유전자가 기본적으로 대사과정에 관여하는 유전자이기 때문에 대사과정에 관여하는 유전자들의 돌연변이 균주들은 실제로 telomeric silencing에 관여하지 않음에도 FOA 배지에서의 성장이 변화를 주기도 한다(Rossmann *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011).

따라서, 더 빠르고 쉽게 Sir complex에 의한 subtelomeric gene silencing의 조절단백질을 찾게 해줄 방법이 필요하다. Yeast에는 single gene deletion strain들의 library가 널리 보급되어 있고, 이 돌연변이 주들의 mRNA를 추출하여 subtelomere 표적 유전자들의 gene silencing에 결함이 생기는지 qRT-PCR로 확인하는 방법은 아주 간단하다(Giaever and Nislow, 2014). 다만, subtelomere에 있는 상당 수의 유전자들이 Sir complex에 의해 gene silencing이 되지 않거나, 되더라도 유의미한 변화를 관측하기는 어렵기 때문에 Sir complex에 의해 확실히

silencing이 되고 있는 표적유전자를 제시하는 것이 중요하다(Ellahi *et al.*, 2015; Yeom *et al.*, 2022).

*Saccharomyces cerevisiae*에서 subtelomere 유전자들 중 Sir complex에 의해 확실히 silencing되는 표적유전자들을 제시하기 위해 Sir complex의 핵심단백질인 Sir2를 deletion시킨 균주 (*Δsir2*)에서 RNA sequencing한 결과를 분석했고 19개의 표적 유전자 후보군을 선별했다(Yeom *et al.*, 2022). 이들 중 확실한 표적 유전자들을 제시하기 위해, qRT-PCR을 했을 때 *Δsir2*에서 가장 유의미하게 발현이 증가한 6개의 subtelomere 유전자들(*YBL113C*, *YIL177C*, *YEL077C*, *COS12*, *YLL066C*, *YRF1-6*)을 찾았다. 이 6개의 유전자들은 Sir complex를 구성하는 다른 두 단백질들인 Sir3, Sir4가 각각 결실된 돌연변이 주에서도 확실하게 발현이 증가했고, Sir complex가 telomere에 올 수 있도록 도와주는 두 단백질인 yKu70, yKu80가 각각 결실된 균주에서도 확실히 발현이 증가하였다(Moretti *et al.*, 1994; Mishra and Shore, 1999; Moretti and Shore, 2001; Kueng *et al.*, 2013). 만일 어떤 유전자의 돌연변이 주에서 이 6개의 marker 유전자들의 발현이 증가했다면 그 유전자는 *S. cerevisiae*에서 telomere position effect와 gene silencing의 잠재적인 조절자로 정의할 수 있다. 이런 점에서 여러 염색체의 subtelomeric region에 흩어져 있는 이 유전자들을 TPE 조절자를 찾기 위한 새로운 마커 유전자로 제안할 수 있다.

재료 및 방법

Saccharomyces cerevisiae 균주

이 연구에 사용된 균주들은 Table 3에 정리되어 있다.

RNA sequencing 데이터 분석

Gene Expression Omnibus (GEO) database에 GSE190545로 게시된 Yeast wild-type 균주(FM391)와 *Δsir2* 균주의 RNA sequencing data를 이용하여 분석했다(Yeom *et al.*, 2022). Yeom *et al.*(2022)의 연구와 동일한 방식으로 raw data를 processing 하였는데, 간단히 설명하자면 QC (FastQC) - Trimming (Trimomatic) - QC (FastQC) - Alignments of reads to reference genome (Tophat2)을 순서대로 수행했다(Kim *et al.*, 2013; Bolger *et al.*, 2014). 이후 Samtools를 이용하여 bam file들을 bed format으로 변환했고, TDF command를 통해 sorting된 data들을 TDF format의 file로 변환하였다. TDF file은 IGV (Integrative genomics viewer)를 통해 시각화하였다(Robinson

et al., 2011). DESEQ2 software를 통해 *Asir2* 균주에서 유의미하게 발현이 변화된 유전자들(DEGs; Differentially expressed genes)들을 선별했다(Love *et al.*, 2014).

RNA preparation from *S. cerevisiae* cells and cDNA synthesis

OD₆₀₀ = 1.0, 10 ml의 yeast cell들을 가지고 MN (Macherey-nagel) Nucleospin® RNA II kit (740955.5)의 설명서에 따라 RNA를 추출하였다. Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers으로 RNA를 정량한 후, 500 ng의 RNA를 TOPscript™ cDNA Synthesis Kit (Enzymatics EZ005S)의 설명서에 따라 oligodT primer를 이용해서 cDNA로 합성했다.

Quantative RT PCR (qRT-PCR)과 통계 분석

1/100로 희석한 cDNA 2.5 µl + 1 µM농도의 Forward와 Reverse primer 각각 2.5 µl씩 + 7.5 µl의 Enzymatics Topreal qPCR 2X premix (SYBR green with low ROX) (Cat. RT500M)을 합쳐서 15 µl의 Rxn mixture를 만든 후 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Instrument를 이용하여 qPCR premix의 권장 설명서에 따라 qRT-PCR 실험을 수행하였다. 4번의 독립적인 qRT-PCR 실험 후 *ACT1* 유전자의 발현양으로 normalization이 끝난 값들의 평균과 표준편차를 구하여 막대 그래프를 그렸다. 통계 분석을 위해 F-검정을 통해 등분산/이분산을 판별했고, 등분산 또는 이분산 가정 두 집단 간의 T-검정을 통해 나온 *p*-value에 따라 샘플 간의 변화가 유의미한지 판별하였다.

PCR

Thermo fisher사의 Dream Taq polymerase의 권장 설명서에 따라 10 µl의 rxn mixture를 만들었고, 이 때 1/100로 희석한 cDNA 1 µl를 template로 사용하였다. Dream Taq polymerase의 권장 설명서에 따라 PCR cycle을 정했으며, *ACT1*의 경우 27 cycles, 나머지 subtelomere marker gene들은 30 cycles로 설정하였다.

결 과

이전의 연구를 통해 *S. cerevisiae*의 32개 telomere ends에서 20 kb 이내에 위치하고 있는 242개의 유전자(Subtelomeric genes = 242)들을 확인했고, *Asir2*균주의 mRNA sequencing

data 분석을 통해 *Asir2*에서 발현이 유의미하게 변화한 유전자들을 선별하였다(Yeom *et al.*, 2022). 그 결과, Sir2에 의해 발현이 억제되고 있었던 44개의 유전자들(Increased genes at *Asir2* strain, n = 44, *p*-value < 0.05)과 발현이 증가했던 4개의 유전자들(Decreased genes at *Asir2* strain, n = 4, *p*-value < 0.05)을 보고하였다(Yeom *et al.*, 2022) (Table 1). 즉, subtelomere의 유전자들의 다수(198/242; 약 82%)가 Sir2-dependent한 gene silencing을 겪지 않거나, 보편적인 방법으로 silencing이 되고 있다는 것을 확인하기 어렵다는 것이다.

Sir2에 의해 가장 확실하게 silencing되는 유전자들을 찾기 위해 Sir2에 의해 발현이 억제되고 있었던 44개의 유전자들(Increased genes at *Asir2* strain, n = 44, *p*-value < 0.05) 중 (1) 가능한 다른 telomere에 위치해 있고, (2) *Asir2*에서 발현 증가율(log2Foldchange)이 크며, (3) *Asir2*에서의 발현량(Reads per million; RPM)이 높고, (4) RT-PCR 또는 qRT-PCR에 의해 만들어질 amplicon에 비해 긴 300 bp 이상의 19개 유전자들을 선별했다(Fig. 1 and Table 2). RNA sequencing 결과가 유효한지 확인하기 위해 *Asir2*에서 추출한 RNA를 cDNA로 합성한 후 19개의 표적 유전자들에 결합하는 primer set으로 qRT-PCR 하였다(Figs. 1의 IGV track 내의 빨간 박스, 2A and Table 4). 반복적인 실험들에서도 Sir2에 의해 silencing이 될 것으로 생각되는 확실한 표적들을 제시하기 위해, *p*-value에 따라 가장 유의미한 6개의 유전자들(*YBL113C*, *YIL177C*, *YEL077C*, *COS12*, *YLL066C*, *YRF1-6*)을 선별했다(Figs. 1, 2A and 2B). qRT-PCR 결과의 유효함을 한 번 더 확인하기 위해, cDNA를 가지고 RT-PCR을 한 후, agarose gel에 확인했다(Fig. 2C). 적어도 이 6개의 표적 유전자들이 *Asir2*에서 발현이 확실히 증가한다는 것을 한 번 더 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

Sir2는 Sir3, Sir4와 함께 Sir complex를 이루고, telomere heterochromatin은 이 Sir complex의 spreading에 의해 형성된다(Kueng *et al.*, 2013). 따라서, 이 표적 유전자들이 Sir complex에 의해 silencing이 되는 유전자들이라면 Sir3 혹은 Sir4가 결실된 돌연변이 주에서도 발현이 확실히 증가해야 한다. 6개의 표적 유전자 중 *COS12*는 기존에 *URA3* reporter 유전자가 삽입되어 있는 *ChrVII-L*에 위치한 유전자이면서, 이 reporter assay를 통해 telomeric silencing 조절단백질로 제시된 *ARD1*, *DOT1*, *SWI4*의 결실 돌연변이 주에서 일관되게 silencing의 결함이 생기는 유전자이다(Takahashi *et al.*, 2011). 반면, *ERR3*는 subtelomere에 있지만 Sir2가 결실된 상황에서 적어도 유의미하게 발현이 증가하지는 않는 것으로 보이는 유전자이다(Fig. 1, 2A and 2B). *COS12*와 *ERR3*, 이 두 유전자들을 Sir complex에 의한 silencing의 positive와 negative control로 설정한 후, 5

Table 1. Distribution of subtelomere genes (n = 242) in each telomere of *Saccharomyces cerevisiae* and change in expression in *Δsir2*

Chromosome	Arm	Subtelomeric genes (n = 242), genes are arranged according to the proximity to each telomere end			
		SEOI	YAL065C	YAL064W-B	TDA8
I	L	PAU8	YAL067W-A	YAR066W	YAR064W
	R	PHO11	YAR068W	YBL111C	PAU9
II	L	YBL113C	YBL112C	MAL32	YBR298C-A
	R	COS2	PAU24	MAL33	YBR296C-A
III	L	GEX1	VBA3	YCL068C	HMLALPHA2
	R	YCR108C	AAD3	RDS1	ADH7
IV	L	COS7	MPH2	SOR2	HXT15
	R	YRF1-1	PAU10	YDR541C	IRC4
V	L	YEL077C	YEL076C-A	YEL075C	YEL073C
	R	YRF1-2	YER190C-B	YER189W	YER188W
VI	L	YFL068W	YFL067W	YFL066C	YFL065C
	R	YFR057W	IRC7	YFR054C	HKK1
VII	L	COS12	YGL262W	PAU11	YGL260W
	R	YRF1-3	COS6	PAU12	MAL12
VIII	L	YHL050C	YHL049C	COS8	YHL048C-A
	R	YHR219W	YHR218W	IMD2	PHO12
IX	L	YHL177C	PAU14	VTH1	IMA3
	R	YR042C	PAU15	YPS6	GTT1
X	L	YJL225C	PAU1	VTH2	IMA4
	R	COS5	MPH3	SORI	HXT16
XI	L	PAU16	YKL222C	MCH2	FRE2
	R	GEX2	VBA5	NFT1	FLO10
XII	L	YLL067C	YLL066W-B	YLL066C	PAU18
	R	YRF1-5	YRF1-4	YLR464W	YLR462W
XIII	L	YML133C	COS3	YML131W	ERO1
	R	PAU19	ERR3	SNO4	YMR321C
XIV	L	YRF1-6	COS1	DDI3	SNO2
	R	YNR077C	PAU6	COS10	YNR075C-A
XV	L	YOL166W-A	AAD15	YOL164W-A	BDS1
	R	YRF1-8	PAU21	YOR394C-A	ERR1
XVI	L	YRF1-7	PAU22	ERR2	HSP32
	R	YPR204W	YPR203W	YPR202W	ARR3

Legend: : increased genes at *Δsir2* strain (n = 44, p < 0.05)
 : decreased genes at *Δsir2* strain (n = 4, p < 0.05)
The list shows the subtelomeric genes (n = 242) located within 20 kb from ends of 16 chromosomes in *S. cerevisiae* as a previous study (Yeom et al., 2022). After reanalyzing mRNA sequencing results of wildtype and *Δsir2* strain reported in a previous study (Accession number GSE190545 from Gene Expression Omnibus database; [Yeom et al., 2022]), we confirmed and listed the increased genes (highlighted as red colors; n = 44, p < 0.05) and decreased genes (highlighted as blue colors; n = 4, p < 0.05) at *Δsir2* strain.

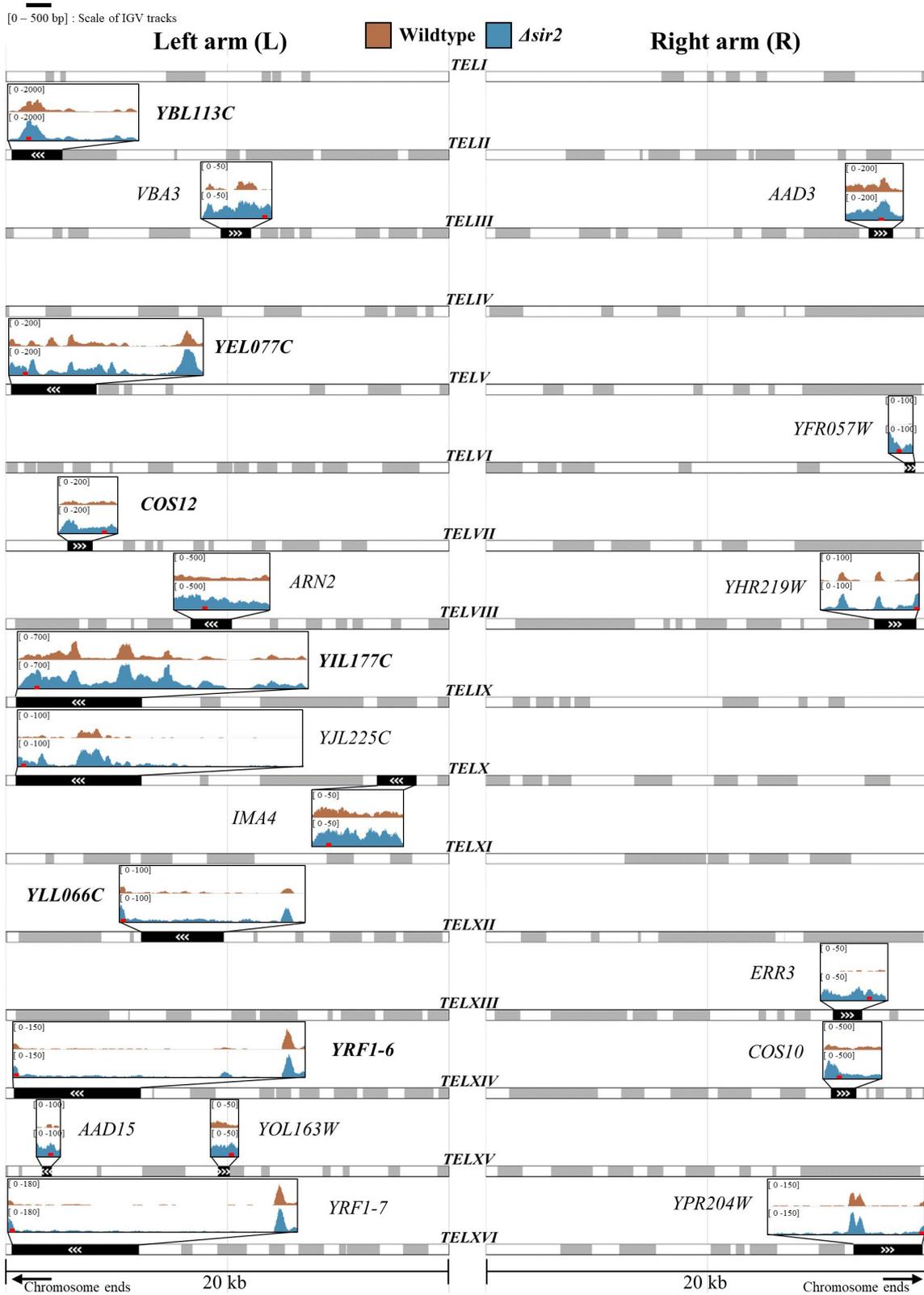


Fig. 1. Expression levels of 19 candidates of subtelomere marker genes in *Asir2* strain and their loci within *S. cerevisiae* genome. Thirty two subtelomere regions (within 20 kb from each telomere end) from 16 chromosomes in *S. cerevisiae* genome are depicted in the schematic diagram. Subtelomere genes and selected 19 candidates of marker genes are highlighted as gray and black boxes, respectively. IGV tracks show the mapped reads of RNA sequencing from Wild-type (orange color) and *Asir2* (blue color) strains. Amplicon of qPCR primer set is highlighted as red box in each IGV track.

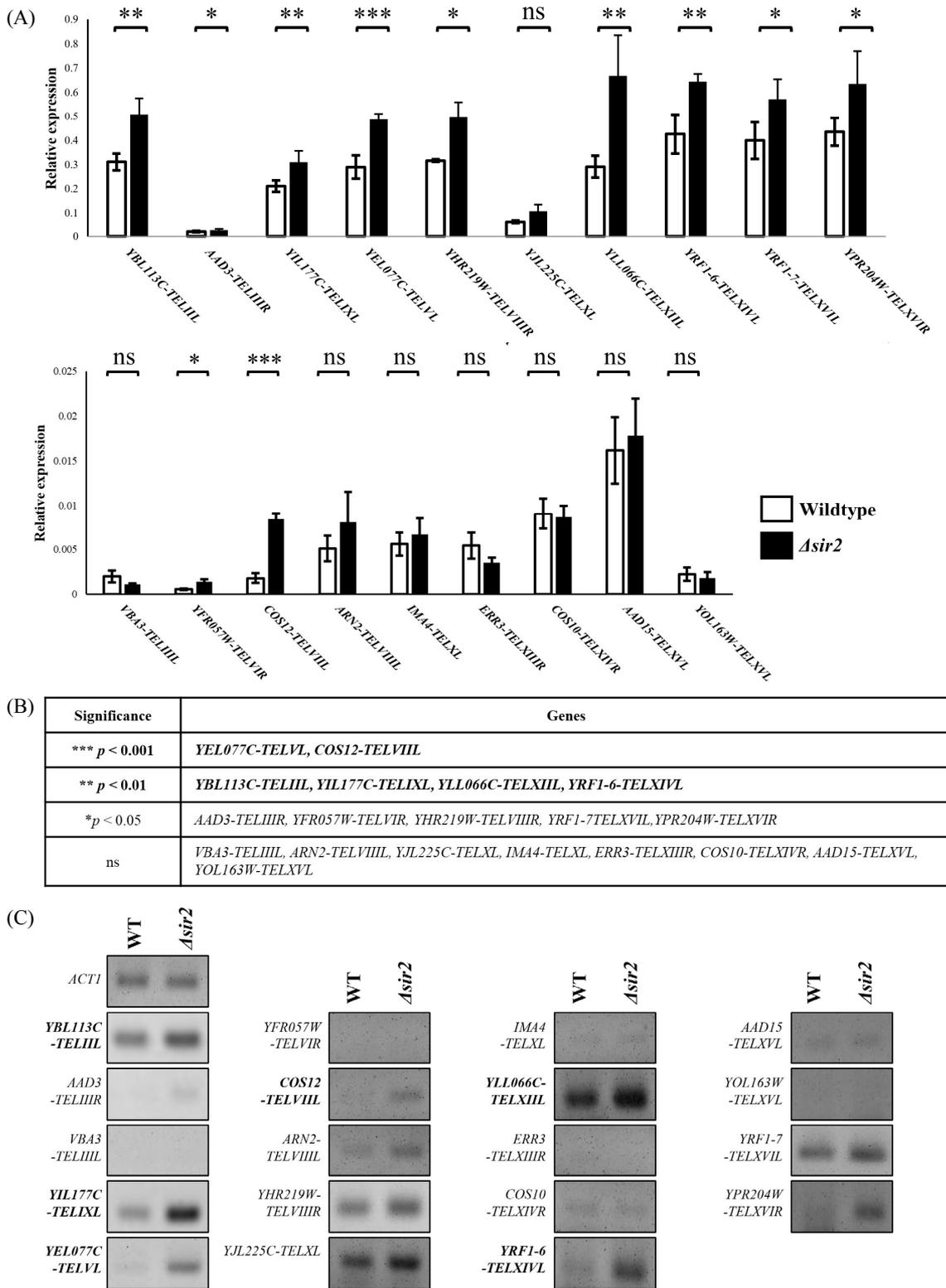


Fig. 2. Six marker genes are selected from 19 candidates of marker genes for subtelomere gene silencing. (A) qRT-PCR results show the expression of each of 19 candidate genes in Wild-type and $\Delta sir2$ strain. Expression level of each gene was normalized with that of *ACT1*. Bar graph shows the average and standard deviation of four independent experiments. To verify the significance of differential expression, student's t-test was performed and (B) six marker genes with highest significance were selected as the marker genes (ns: not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) RT-PCR of cDNA templates and agarose gel electrophoresis were performed for further validation of the qRT-PCR results. This Figure shows the representative data of four independent RT-PCR experiments.

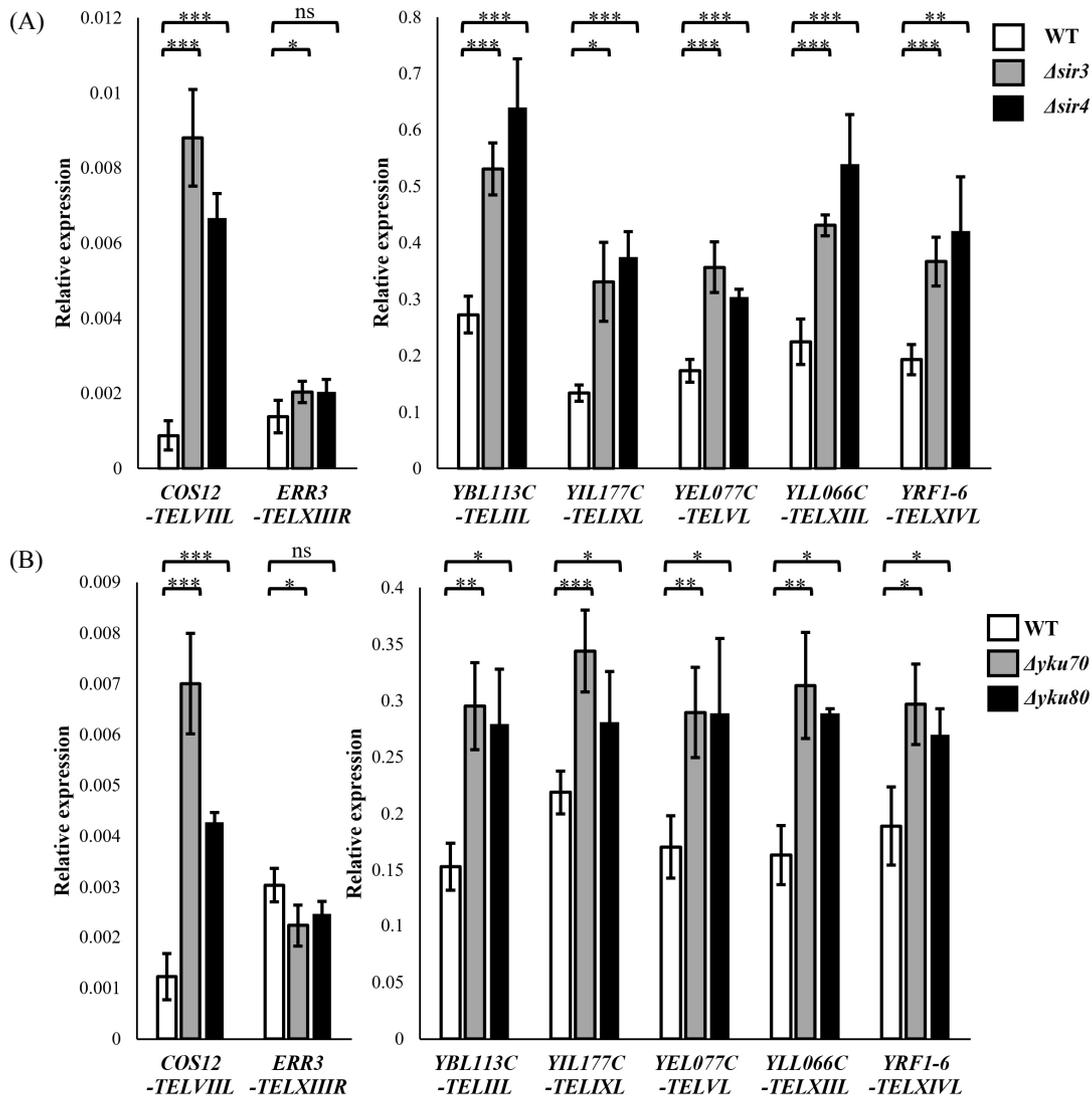


Fig. 3. Six marker genes are definitely silenced by Sir complex. qRT-PCR results show the expression of marker genes, *YBL113C*, *YIL177C*, *YEL077C*, *YLL066C*, and *YRF1-6* in (A) *Asir3* and *Asir4* strains or (B) *Ayku70* and *Ayku80* strains. *COS12* was not only selected as the marker gene, but also as the positive control due to its localization in *TEL07L*, the telomere for conventional reporter assay. *ERR3* had been among the 19 marker candidates, but was used as the negative control since expression was not significantly changed at validation experiments.

개의 표적 유전자들(*YBL113C*, *YIL177C*, *YEL077C*, *YLL066C*, *YRF1-6*)이 정말 Sir complex에 의해 확실히 silencing되는 유전자들인지 확인하는 실험을 진행했다. *Asir3*, *Asir4* 균주의 qRT-PCR을 했을 때 5개의 표적 유전자들과 *COS12*의 발현이 모두 확실히 증가하는 것을 확인했다(Fig. 3A). 반면, *SIR2*가 결실 되었을 때 발현이 변화가 없거나 오히려 감소했던 *ERR3*는 *SIR4*가 없을 때 유의미한 발현 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3A).

Telomere는 TG1-3 telomere repeat으로 이루어져 있고, 이 cis-element들에 Rap1이 먼저 결합하고, Sir complex의 component 중 Sir4가 Rap1에 의해 telomere에 결합하게 된다(Kyrion et

al., 1993; Moretti et al., 1994; Moretti and Shore, 2001; Luo et al., 2002; Kueng et al., 2013). 이 때, Rif1/2가 Rap1의 C-terminal domain을 두고 Sir4와 경쟁하는데, chromosome ends에 결합하는 heterodimer인 yKu70/80 complex가 이 경쟁관계에서 Rap1과 Sir4의 결합을 도와준다(Kyrion et al., 1993; Mishra and Shore, 1999). 결국, yKu70, yKu80, Rap1 등은 Sir complex (Sir2,3,4)가 telomere에 결합하는 것을 도와주며, Sir complex에 의한 telomere heterochromatin 형성을 도와준다(Moretti et al., 1994; Mishra and Shore, 1999; Moretti and Shore, 2001; Kueng et al., 2013). Rap1은 essential gene이라서 결실 돌연변이 균주의 제작이 불가능하기 때문에(Shore and Nasmyth,

Table 2. Information about 19 candidates of subtelomere marker genes

Telomere	Product	Length	Log2 FoldChange	Adjusted <i>p</i> -value	Normalized values of mapped reads			
					WT1	WT2	Δ sir2-1	Δ sir2-2
TELII-L	YBL113C	2379	1.220287	0.013331	625.06	632.5435	1065.964	1859.707
TELIIR-R	AAD3	1092	1.239363	0.005548	220.1848	254.1793	489.2608	627.9674
TELIIL-L	VBA3	1377	3.277489	6.27E-09	11.43036	22.51303	154.0651	171.5638
TELIX-L	YIL177C	5665	1.358174	0.001483	1523.245	1473.514	2964.712	4713.605
TELV-L	YEL077C	3834	1.356004	0.009462	234.6231	207.7008	405.9824	722.5475
TELVI-R	YFR057W	456	7.836721	4.26E-10	0.601598	0.726227	145.7373	155.0673
TELVII-L	COS12	1143	2.705257	1.97E-09	77.6061	85.69475	691.211	377.2204
TELVIII-L	ARN2	1863	2.166007	8.46E-12	434.3535	429.2	1898.748	1976.283
TELVIII-R	YHR219W	1875	1.990529	0.014746	16.24314	21.7868	52.04902	96.77957
TELX-L	YJL225C	5665	2.232986	0.000957	45.72142	63.18172	126.9996	380.5197
TELX-L	IMA4	1770	1.576794	0.003574	62.56616	56.64568	154.0651	200.1577
TELXII-L	YLL066C	3717	2.024473	0.003145	34.89267	42.84738	91.60628	221.0533
TELXIII-R	ERR3	1314	4.994489	2.90E-07	1.804793	2.904907	41.63922	104.4779
TELXIV-R	COS10	1125	1.342867	0.038346	232.8183	244.7384	345.6055	861.1182
TELXIV-L	YRF1-6	5728	1.454701	0.006881	87.83326	105.3029	206.1141	320.0324
TELXV-L	AAD15	432	3.298207	3.47E-07	7.82077	14.52453	95.7702	120.9745
TELXV-L	YOL163W	510	1.93748	0.026982	12.63355	18.88189	49.96706	69.28537
TELXVI-L	YRF1-7	5728	1.665458	0.002313	83.02048	96.58815	201.9502	364.0232
TELXVI-R	YPR204W	3099	1.698954	0.017627	52.9406	55.19323	97.85216	249.6473

Table 3. Yeast strains used in this study

Strains		Genotype	Source
FM391	FM391	MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0	BY4741
<i>Asir2</i>	JL400	MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 sir2::KanMX	Yeast KO library
<i>Asir3</i>	JL1188	MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 sir3::KanMX	Yeast KO library
<i>Asir4</i>	JL1189	MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 sir4::KanMX	Yeast KO library
<i>Ayku70</i>	JL1205	MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 yku70::KanMX	Yeast KO library
<i>Ayku80</i>	JL1206	MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 yku80::KanMX	Yeast KO library

1987), Rap1을 제외한 yKu70 혹은 yKu80가 결실된 돌연변이 주에서 6개의 표적 유전자들이 Sir complex에 의해 silencing 되는지 확인하기 위해 qRT-PCR을 했다(Fig. 3B). 5개의 표적 유전자들과 *COS12*는 yKu70 혹은 yKu80의 돌연변이 균주에서 발현이 확실히 증가했지만, *ERR3*의 경우 발현이 증가하지 않았다. 결론적으로, 우리는 이 연구를 통해 subtelomere에 있는 많은 유전자들 중 Sir complex에 의해 확실히 gene silencing을 겪는 6개의 유전자들(*YBL133C*, *YIL177C*, *YEL077C*, *YLL066C*, *YRF1-6*)을 제시한다. Subtelomere gene들(n = 242)중 일부가 확실하게 Sir complex에 의해 silencing이 되기 때문에, 이 6개의 표적 유전자들은 *S. cerevisiae*에서 Sir complex 의존적인 gene silencing의 조절단백질을 선별하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

고찰

이전 많은 연구에서는 telomeric silencing의 조절유전자들을 screening하기 위하여 해당 균주에 reporter 유전자(*URA3*)를 telomere에 삽입한 균주를 제작했고, 해당 균주가 FOA 배지에서 생존하는지 확인하여 telomeric silencing 여부를 판단하였다(Gottschling *et al.*, 1990; Aparicio *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1997; Nislow *et al.*, 1997; Singer *et al.*, 1998). 이 방법은 high-throughput sequencing 및 annotation이 발전하기 이전에 많은 subtelomeric silencing의 조절자를 찾게 해주었다. 하지만 균주를 제작하는 데 번거롭고, telomere에 삽입된 유전자들은 자연적으로 그 locus에 있는 게 아니기 때문에 자연적인 telomere가 telomeric silencing 조절자의 후보에 의해 silencing이 되는지 확인하는 추가적인 노력이 필요하다. 또한, 5-FOA에

Table 4. Primers used in this study

Primer name	Sequence
F-ACT1-1120-RT	CTGCCGGTATTGACCAAACCT
R-ACT1-1264-RT	CGGTGATTTCCTTTTGCAATT
YBL113C-F-RT	CGCTCGAGAAAAGTTGGAGTT
YBL113C-R-RT	CTGTCGATGATGCCTGCTAAA
AAD3-F-RT	CCAAGGTAATGGAACGTGTTG
AAD3-R-RT	AAATCTCCACCTCCCATGAC
VBA3-F-RT	AGCGACTCCATTAAGAACGTATT
VBA3-R-RT	TATCTTCTGGTGTCTCGTCCT
YIL177C-F-RT	GACAGTTGAGGAGCAGATATGAA
YIL177C-R-RT	CCTATCAGCATCGAGAGGAATG
YEL077C-F-RT	CTAGGAATGCACCTTGCAGAT
YEL077C-R-RT	GTAGAACAGCCCTATCAGCATC
YFR057W-F-RT	CCTTTCTTTGCGTGGCAATATAC
YFR057W-R-RT	CTGAGACGAAGTCGTTGCTAAA
COS12-F-RT	GCTTACTTAAACGGTCTCCTACT
COS12-R-RT	ACCTGAATTGTGCGATCCCTATT
ARN2-F-RT	AGCATATGGCTCACCCTAAC
ARN2-R-RT	GAAGGAACATAGGCGCTGAA
YHR219W-F-RT	TGGTAGCGGTTACAAAAGAG
YHR219W-R-RT	CCAACTTCTCTGCTCGAATCT
YJL225C-F-RT	CGGTTACAAAAGAGCTGGATAG
YJL225C-R-RT	TCTCTGCTCGAATCCCTACATAA
IMA4-F-RT	GGAAGGAGGCCTTGAGATTTAG
IMA4-R-RT	TGTGAAGCTGAACAGTTTCTTATTG
YLL066C-F-RT	TGGTAGCGGTTACAAAAGAG
YLL066C-R-RT	CCAACTTCTCTGCTCGAATCT
ERR3-F-RT	GTCCAGCTCAGTTAGCAGAATA
ERR3-R-RT	CCACGAGGACCAATCATCTT
COS10-F-RT	GCCAGTAGTTCAAATACAGTACA
COS10-R-RT	CGTCCCAATCAGCAGAGTAT
YRF1-6-F-RT	TGGTAGCGGTTACAAAAGAG
YRF1-6-R-RT	CCAACTTCTCTGCTCGAATCT
AAD15-F-RT	CCGAACAAACAGATGCAGAAAT
AAD15-R-RT	CCTTAGAGCGAACATAGGCAATA
YOL163W-F-RT	GAAAGGATGGTTCAGTGAAGG
YOL163W-R-RT	AGTGACATACCTTGCCTATTGTT
YRF1-7-F-RT	TGGTAGCGGTTACAAAAGAG
YRF1-7-R-RT	CCAACTTCTCTGCTCGAATCT
YPR204W-F-RT	TGGTAGCGGTTACAAAAGAG
YPR204W-R-RT	CCAACTTCTCTGCTCGAATCT

서 균주가 죽는 것을 확인해도 그 원인이 silencing의 결함에 의해 생긴 것인지, 아니면 이 유전자가 nucleotide, amino acid 등의 대사경로를 조절하여 생긴 일인지 판단하기 어렵다(Rossmann *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011).

이러한 문제점들을 극복하기 위해 우리는 *S. cerevisiae* genome database를 이용하여 32개에 해당하는 모든 telomere 들에서 242개의 annotation된 subtelomere gene들을 선별하였고, Sir complex 단백질(Sir2, Sir3, Sir4)의 결실돌연변이 주들의 RNA sequencing을 했을 때 놀랍게도 Sir complex에 의한 silencing이 일부 유전자에만 나타난다는 것을 확인하였다(44/242; 약 18%) (Yeom *et al.*, 2022) (Table 1). 심지어 표적 유전자로 선정된 19개의 유전자들 중 *ERR3* 등이 Sir complex에 의해 silencing 되지 않고 있는 것으로 보아, 확실히 Sir complex에 의해 silencing 되는 유전자들이 상당히 제한적이라는 것을 알 수 있었다(Figs. 2, 3). 따라서 TPE의 조절단백질 후보군들이 정말로 TPE를 조절하는 지 알기 위해서는 이 일부의 subtelomere 유전자들 중 확실히 Sir complex와 TPE에 의해 gene silencing 을 겪는 유전자들을 제시해야한다.

또한 우리는 telomere들 간의 이질성(heterogeneity)을 고려하여 가능하면 다른 telomere에 분포하는 marker 후보유전자들을 선별했다(Fig. 1 and Table 1). 실제 *S. cerevisiae*의 telomere 들을 현미경으로 보면 32개의 telomere가 몇개의 foci로 clustering 이 되어있는 것이 관찰된다(Gotta *et al.*, 1996; Taddei *et al.*, 2004). 또한, telomere간에도 TPE에 의한 일관된 조절을 받는 게 아니라 각 telomere마다 Sir complex의 spreading에 의해 형성되는 heterochromatin domain의 너비가 다르기 때문에 어떤 임의의 TPE 조절 단백질이 특정 telomere만 조절할 가능성도 있을 것으로 보이고, 이를 감안하기 위해 가능하면 많은 telomere들을 볼 수 있는 marker 유전자들을 선별했다(Yeom *et al.*, 2022). 결론적으로, 이 marker 유전자들을 활용하여 우리는 더 빠르고 쉽게 Sir complex에 의한 TPE와 telomeric silencing의 조절단백질을 찾을 수 있을 것으로 기대한다.

적 요

많은 진핵생물의 telomere는 heterochromatin 구조로 이루어져 있고 telomere 근처의 유전자들은 telomeric heterochromatin의 퍼짐(spreading)에 의해 발현이 억제되는 telomere position effect (TPE)를 겪는다. *Saccharomyces cerevisiae*는 이질염색질과 TPE 연구에 좋은 모델 생물체로 사용되었다. 특히, *ChrVII-L*의 telomere에 uracil 생합성 유전자(*URA3*)를 삽입한 균주를 통해 TPE 조절단백질들을 screening하는 방법이 널리 사용되어왔다. 하지만, 균주를 새로 제작해야 하고, 이 reporter assay의 결과가 유효한지 추가적으로 확인해야하는 등의 번거로움이 있다. 이 연구를 통해 우리는 TPE의 영향으로 확실히 silencing

상태로 다양한 염색체의 subtelomere 부분에 존재하는 6개의 마커 유전자들을 소개한다. 기존에 사용되었던 *ChrVII-L*의 subtelomeric region에 삽입된 *URA3* 마커와 비교했을 때, 이 6개의 마커 유전자들은 여러 염색체의 subtelomeric region에 존재하기 때문에, 실시간 PCR를 통해서 잠재적인 TPE의 조절단백질이 subtelomere gene silencing을 조절하는지를 명확하게 해줄 것이다.

감사의 말

이 논문은 한국연구재단의 지원(NRF-2020R1H1A3072234, 2020R1A6A3A13077356, NRF-2022R1A6A3A01087657)을 받아 수행되었다.

Conflict of Interest

Jung-Shin Lee is Editor of KJM. She was not involved in the review process of this article. Also, Authors have no conflicts of interest to report.

References

- Aparicio OM, Billington BL, and Gottschling DE.** 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279–1287.
- Bi X.** 2014. Heterochromatin structure: lessons from the budding yeast. *IUBMB Life* **66**, 657–666.
- Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, and Fink GR.** 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154**, 164–175.
- Bolger AM, Lohse M, and Usadel B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120.
- Ellahi A, Thurtle DM, and Rine J.** 2015. The chromatin and transcriptional landscape of native *Saccharomyces cerevisiae* telomeres and subtelomeric domains. *Genetics* **200**, 505–521.
- Giaever G and Nislow C.** 2014. The yeast deletion collection: a decade of functional genomics. *Genetics* **197**, 451–465.
- Gotta M, Laroche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, and Gasser SM.** 1996. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **134**, 1349–1363.
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, and Zakian VA.** 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell.* **63**, 751–762.
- Grewal SI and Jia S.** 2007. Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 35–46.
- Hoppe GJ, Tanny JC, Rudner AD, Gerber SA, Danaie S, Gygi SP, and Moazed D.** 2002. Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4167–4180.
- Huang H, Kahana A, Gottschling DE, Prakash L, and Liebman SW.** 1997. The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6693–6699.
- Johnson A, Li G, Sikorski TW, Buratowski S, Woodcock CL, and Moazed D.** 2009. Reconstitution of heterochromatin-dependent transcriptional gene silencing. *Mol. Cell* **35**, 769–781.
- Kim D, Perteau G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, and Salzberg SL.** 2013. Tophat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36.
- Krogan NJ, Dover J, Khorrami S, Greenblatt JF, Schneider J, Johnston M, and Shilatifard A.** 2002. COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 10753–10755.
- Kueng S, Oppikofer M, and Gasser SM.** 2013. SIR proteins and the assembly of silent chromatin in budding yeast. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 275–306.
- Kyrion G, Liu K, Liu C, and Lustig AJ.** 1993. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**, 1146–1159.
- Love MI, Huber W, and Anders S.** 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.
- Luo K, Vega-Palas MA, and Grunstein M.** 2002. Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* **16**, 1528–1539.
- Miller T, Krogan NJ, Dover J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Johnston M, Greenblatt JF, and Shilatifard A.** 2001. COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12902–12907.
- Mishra K and Shore D.** 1999. Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr. Biol.* **9**, 1123–1126.
- Moretti P, Freeman K, Coodly L, and Shore D.** 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* **8**, 2257–2269.
- Moretti P and Shore D.** 2001. Multiple interactions in Sir protein recruitment by Rap1p at silencers and telomeres in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8082–8094.
- Nislow C, Ray E, and Pillus L.** 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2421–2436.

- Oh J, Yeom S, Park J, and Lee JS.** 2022. The regional sequestration of heterochromatin structural proteins is critical to form and maintain silent chromatin. *Epigenetics Chromatin*. **15**, 5.
- Reuter G and Wolff I.** 1981. Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 516–519.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, and Mesirov JP.** 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26.
- Rossmann MP, Luo W, Tsaponina O, Chabes A, and Stillman B.** 2011. A common telomeric gene silencing assay is affected by nucleotide metabolism. *Mol. Cell* **42**, 127–136.
- Rudner AD, Hall BE, Ellenberger T, and Moazed D.** 2005. A nonhistone protein-protein interaction required for assembly of the SIR complex and silent chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4514–4528.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, and Reuter G.** 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* **21**, 1121–1131.
- Shore D and Nasmyth K.** 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**, 721–732.
- Singer MS, Kahana A, Wolf AJ, Meisinger LL, Peterson SE, Goggin C, Mahowald M, and Gottschling DE.** 1998. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**, 613–632.
- Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Bauer C, and Gasser SM.** 2004. Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J.* **23**, 1301–1312.
- Takahashi YH, Schulze JM, Jackson J, Hentrich T, Seidel C, Jaspersen SL, Kobor MS, and Shilatifard A.** 2011. Dot1 and histone H3K79 methylation in natural telomeric and HM silencing. *Mol. Cell* **42**, 118–126.
- Yeom S, Oh J, and Lee JS.** 2022. Spreading-dependent or independent Sir2-mediated gene silencing in budding yeast. *Genes Genom.* **44**, 359–367.