

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

***Candida albicans*'i Taf2 ja Taf14 valgu interaktsioon pagaripärmi
mudelsüsteemis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Mona Rebeka Adson

Juhendaja PhD Signe Värv

TARTU 2026

INFOLEHT

***Candida albicans*'i Taf2 ja Taf14 valgu interaktsioon pagaripärmi mudelsüsteemis**

Igal aastal surevad miljonid inimesed seeninfektsioonide tagajärjel. Ravimiresistentsete patogeenide leviku tõttu on seenhaiguste raviks vaja leida uusi terapeutilisi sihtmärke. Üheks potentsiaalseks sihtmärgiks võib olla kottseentele omane transkriptsioonifaktor, TBP-seoseline faktor 14 (Taf14), mida inimorganismis ei esine. Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* on näidatud Taf14 ja TBP-seoselise faktori 2 (Taf2) vahelist interaktsiooni, mille häirimine põhjustab rakkudes kasvuhäireid. Patogeenses pärmseenes *Candida albicans* osaleb Taf14 hüüfide ja rakuseina moodustumises ning võimaldab säilitada raku kohanemisvõimet peremeesorganismis. Käesolev töö keskendus *C. albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa vahelise interaktsiooni uurimisele. Töö eesmärk oli luua *S. cerevisiae*'l põhinev mudelsüsteem, mis ekspresseerib omavahel interakteeruvaid *C. albicans*'i Taf14 valku ja Taf2 valgu C-terminaalset fragmenti. Konstrueeritud tüve edasine kasutamine võimaldaks uurida selle interaktsiooni inhibeerimist ning looks aluse uute seenhaigustevastaste ravimite väljatöötamiseks.

Märksõnad: Taf2, Taf14, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

The interaction of *Candida albicans* Taf2 and Taf14 proteins in baker's yeast model system

Millions of people die from fungal infections each year, and the rise of drug-resistant pathogens highlights the need for new therapeutic targets. One such target could be the ascomycete-specific transcription factor TBP-associated factor 14 (Taf14), which is absent in humans. In *Saccharomyces cerevisiae*, an interaction between the transcription factors Taf14 and Taf2 has been demonstrated, and its loss leads to growth defects. In the fungal yeast *Candida albicans*, Taf14 is essential for hyphal formation and cell wall development, supporting the pathogen's ability to adapt within the host. This study focused on the interaction between *C. albicans* Taf14 and the C-terminal region of Taf2. The aim was to construct an *S. cerevisiae* strain expressing *C. albicans* interacting Taf2 C-terminal protein fragment and Taf14 protein. Such a strain would enable future experiments to identify inhibitors of this interaction as potential antifungal drug candidates.

Keywords: Taf2, Taf14, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 <i>Candida albicans</i>	6
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transkriptsiooni initsiatsioon	8
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Töö eesmärgid	14
2.2 Materjal ja meetodika	15
2.2.1 <i>Candida albicans</i> 'i Taf2 ja Taf14 seondumise struktuuriennustus	15
2.2.2 Kasutatud plasmiidid ja tüved	15
2.2.3 PCR	19
2.2.4 Agaroosgeelelektroforees	20
2.2.5 Immuunodetektsioon (<i>western blot</i>)	21
2.2.6 Ko-immunosadestamise proovide valmistamine	21
2.3 Tulemused	23
2.3.1 Struktuuriennustused näitavad <i>Candida albicans</i> 'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa seondumist	23
2.3.2 <i>Candida albicans</i> 'i Taf14 valku ja Taf2 C-terminaalset osa ekspresseeriva plasmidi konstrueerimine	24
2.3.3 <i>Candida albicans</i> 'i Taf14 valku ja Taf2 C-terminaalset osa ekspresseeriva pagaripärmi tüve konstrueerimine	26
2.3.4 <i>C. albicans</i> 'i Taf14 valk ja Taf2 C-terminaalne osa interakteeruvad pagaripärmis	28
2.4 Arutelu	32
KOKKUVÕTE	35
RESÜMEE/ SUMMARY	36
TÄNUSÕNAD	38
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	44
LISAD	45
Lisa 1	45
Lisa 2	46
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

ET- *extra-terminal* (ekstra-terminaalne)

Inr- *initiator element* (initsiaator-element)

PIC- *pre-initiation complex* (preinitsiatsioonikompleks)

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (naatriumdodetsüülsulfaat)

TAE- *Tris-Acetate-EDTA buffer* (Tris-atsetaat, EDTA)

TAF- *TBP-associated factor* (TBP-seoseline faktor)

TBP- *TATA-binding protein* (TATA-siduv valk)

TFIIA- *transcription factor II A* (transkriptsioonifaktor II A)

TFIIB- *transcription factor II B* (transkriptsioonifaktor II B)

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

TFIIE- *transcription factor II E* (transkriptsioonifaktor II E)

TFIIF- *transcription factor II F* (transkriptsioonifaktor II F)

TFIIH- *transcription factor II H* (transkriptsioonifaktor II H)

YEATS- YAF9, ENL, AFL, TAF14, SAS5 valkude domeen

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

SISSEJUHATUS

Seeninfektsioonid põhjustavad igal aastal miljonite inimeste surma ning kujutavad endast tõsist ülemaailmset terviseprobleemi. Patogeensetel seentel on arenenud resistentsus olemasolevate seenevastaste ravimite suhtes ning mitmed efektiivsed ravimid võivad avaldada kahjulikku mõju ka inimese organismile. Seetõttu on üha suurem vajadus uute ja ohutumate ravisihtmärkide leidmiseks seeninfektsioonide tõhusamaks raviks (Vitiello jt, 2023).

Patogeensete seente vastane potentsiaalne sihtmärk on kottpärmidele omane transkriptsioonifaktor II D (TFIID) alaühik TBP-seoseline faktor 14 (Taf14). Kuna vastavat valku inimorganismis ei esine, võib selle sihtmärgiks võtmine võimaldada selektiivsemat toimet, vähendades potentsiaalset negatiivset mõju inimese rakkudele. Taf14 osaleb lisaks TFIID regulatsioonile ka mitmetes transkriptsiooni, kromatiini reguleerimise ning histooni atsetüültransferaasi kompleksides (*Saccharomyces Genome Database* kodulehekül, i.a). Varasemates uuringutes on näidatud *Saccharomyces cerevisiae* Taf14 ja samuti TFIID kompleksi kuuluva Taf2 valgu interaktsiooni läbi Taf2 C-terminaalse osa, mis värbab Taf14 alaühiku TFIID kompleksi. Seondumise puudumisel langeb raku kasvukiirus ja stressitaluvus (Klein jt, 2022).

Taf2 ja Taf14 funktsionaalseid interaktsioone on põhjalikult uuritud *S. cerevisiae*'s, kuid nende roll patogeenses pärmseenes *Candida albicans* on vähem selge. *C. albicans* on loomades ja taimedes leiduv oportunistlik patogeen, kes võib põhjustada nii pinnapealseid kui invasiivseid infektsioone. Pärmseene virulentsus sõltub patogeeni võimest kohaneda keskkonnamuutustega ning mitmetest virulentsusfaktoritest (Deorukhkar ja Roushani, 2017; Wang jt, 2020). On näidatud, et Taf14 on oluline *C. albicans*'i eluvõime ja virulentsuse säilitamiseks, kuna geeni puudumine põhjustab häireid geeniekspressioonis ja kromatiini regulatsioonis. Lisaks mõjutab Taf14 puudumine stressivastusega seotud geenide avaldumist (Wang jt, 2020). Taf2 on *C. albicans*'is tuvastatud kui TFIID kompleksi eeldatav alaühik ja selle transkripti taseme tõusu on täheldatud patoloogilistes tingimustes (*Candida Genome Database* kodulehekül, i.a).

Kuna otsene töötamine patogeeniga võib kahjustada inimese tervist, oli käesoleva töö eesmärk luua *C. albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa seondumise uurimiseks *S. cerevisiae* mudelsüsteem. Selleks konstrueeriti esmalt pagaripärmi tüvi, milles ekspresseeriti *C. albicans*'i Taf14 ja Taf2 C-terminaalset osa. Kahe valgu seondumine tuvastati ko-immunosadestamisel. Mudelsüsteem valkude seondumise uurimiseks annab aluse uute ravisihtmärkide testimisele seenhaiguste ravis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

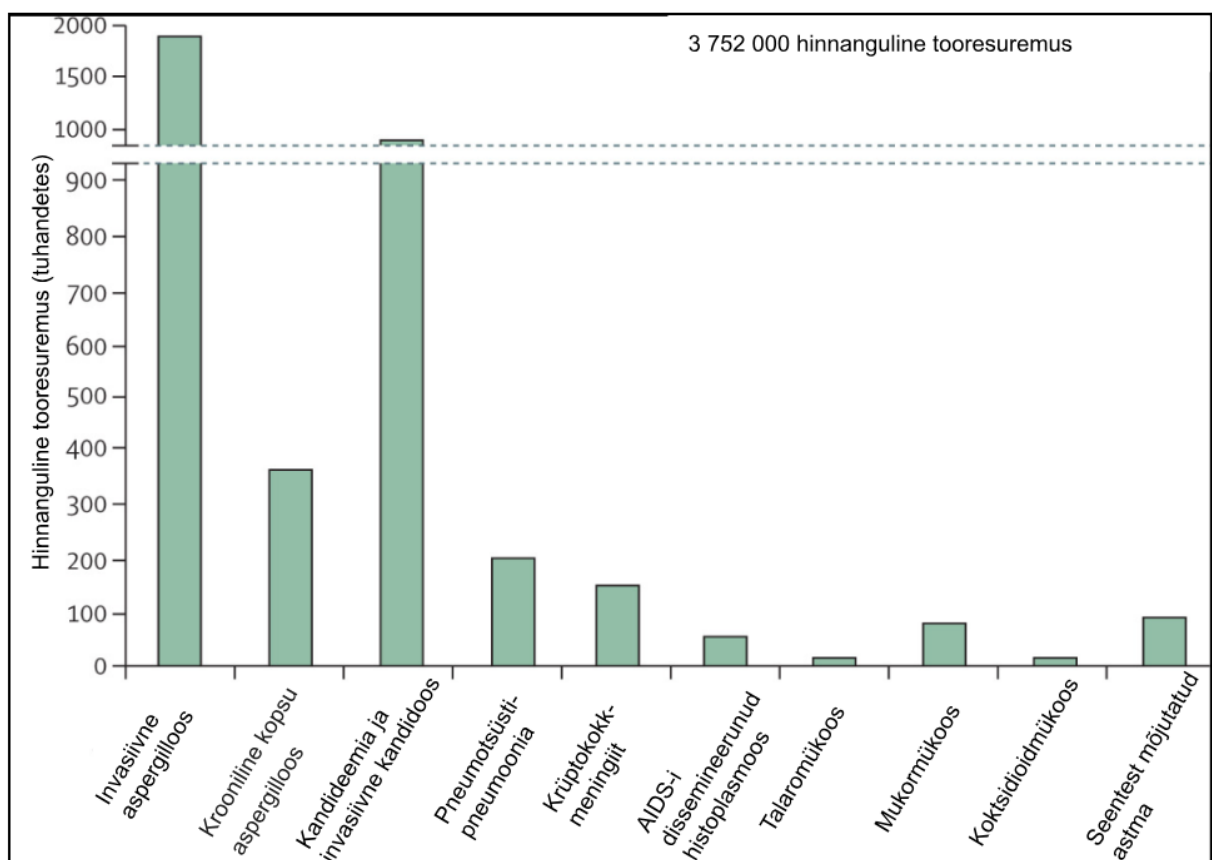
1.1 *Candida albicans*

Candida perekond on loomadest ning ka taimedelt leitavad pärmseened, mis võivad muutuda patogeenseks immuunosupressiooni tagajärel. *Candida albicans*'i leidub nii seedetraktis, tupes, suu-neeluõõnes kui ka inimese nahal ning võib esineda hüüfi, pseudohüüfi või blastosporina (Bensasson jt, 2019; Talapko jt, 2021; Sudbery, 2011). Talapko jt (2021) on jaganud *C. albicans*'i poolt põhjustatud infektsioonid oraalseteks, gastroenteroloogilisteks, dermatoveneroloogilisteks ja invasiivseteks ehk vereringe infektsioonideks.

Kandidoos ehk kandidiaas on levinuim seennakkus suuõõnes, haiguse peamine põhjustaja on *C. albicans*. Kergete kuni mõõdukate *C. albicans*'i põhjustatud oraalsete infektsioonide ravi seisneb tavaliselt seenevastastes ravimites nagu klotrimasool ja mikonasool, raskete infektsioonide korral manustatakse tüüpiliselt flukonasooli oraalset või intravenoosselt (Talapko jt, 2021). *C. albicans* leidub inimese sooletraktis normaalse mikrobiota hulgas, kuid see võib muutuda patogeenseks keskkonna mikrobiota düsbioosi korral, immuunodefitsiidi olukorras või kahjustunud soole-limaskesta barjääri puhul (Allert jt, 2018). Dermatoloogiliselt põhjustab *Candida spp.* enamikest seennakkustest, 80-90% juhtudest on vastutav *C. albicans*. Tüüpiliselt põhjustab *C. albicans* pinnapealseid nahainfektsioone, kuid sügavalt immuunodefitsiidiga patsientides võib nakkus viia süsteemse kandidaasini, mis tihti lõppeb surmaga (Talapko jt, 2021). Süsteemse kandidaasi vastane peamine kasutatav ravim on amfoteritsiin B, kuid mõnedel juhtudel on patogeenis täheldatud resistentsust ravimi suhtes. Samuti on amfoteritsiin B kõrvalnähud märkimisväärselt toksilised patsientidele (Vitiello jt, 2023). Invasiivsed *Candida* infektsioonid tekivad enamasti siis, kui mikroobikoosluse koloniseerumine muutub ebanormaalseks või peremeesorganismi kaitsemehhanismid on häiritud. Selline invasiivne kandidaas võib potentsiaalselt haarata kõiki organeid (Pappas jt, 2018). *C. albicans*'i sattumisel vereringesse võib see põhjustada infektsioone üle kogu keha, sealhulgas infektsioone põies ja neerudes, kopsupõletikku, kõhuõõne infektsioone, endokardiiti ning ka perikardiiti (Talapko jt, 2021). Invasiivse kandidoosi spektrum ulatub minimaalsete haigusnähtutega kandidoosist ägeda sepsiseni, viimasega kaasnev suremus ületab 70% (Doi jt, 2016) (Joonis 1).

C. albicans'i virulentsusfaktorid võimaldavad tal osaleda infektsiooni kujunemises ja süvendamises (Deorukhkar ja Roushani, 2017). *C. albicans* esineb patogeenses vormis hüüfina, lühikesi hüüfe moodustavad mutanttüved kahjustavad peremeesrakke oluliselt vähem kui pikemaid hüüfe moodustavad tüved (Maza jt, 2017). Hüüfilises vormis eritab patogeen

tsütolüütilist toksiini *candidalysine*, mis kahjustab peremeesorganismi epiteeliliseid rakke ning kasutab adhesiine nagu Als3 ja Hwp1, et kinnituda peremeeskoele ja alustada invasiooni (Moyes jt, 2016; Calderone ja Fonzi, 2001; Rosiana jt, 2021). *C. albicans* on võimeline patogeneesi käigus tootma biofilmi, mis võimaldab tal kinnituda peremeesrakule ning ka abiootilistele pindadele nagu implantaadid. Enamikud *C. albicans*'i haigused on seotud pärmseene võimega luua biofilmi, kaitstes end füüsikaliste mõjutuste eest (Tsui jt, 2016). *C. albicans*'i virulentsust ja patogeneesi soodustab ka kolooniate fenotüübiline üleminek sfääriliste valgete ning piklike läbipaistmatute rakkude vahel. See võimaldab *C. albicans*'il kiirelt reageerida keskkonnamuutustele ja põhjustab muutusi filamentses kasvus ning interaktsioonis immunoloogiliste rakkudega *in vitro* (Mallick jt, 2016).



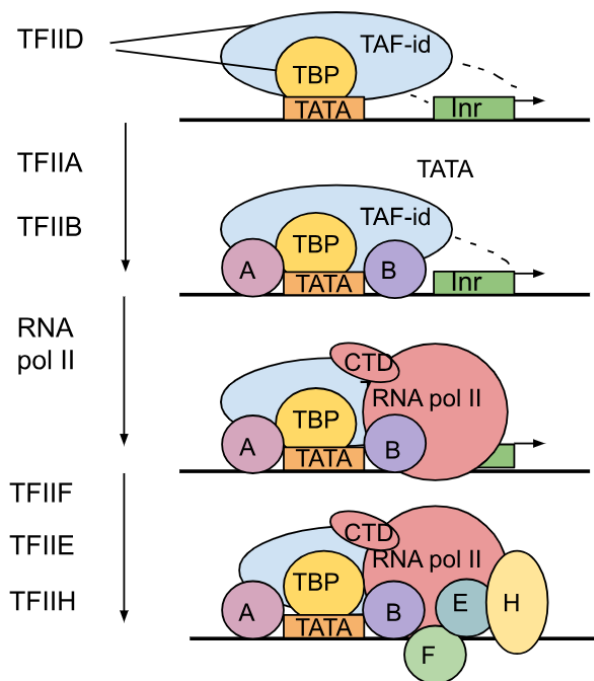
Joonis 1. Hinnanguline ülemaailmne tooresuremus seenhaigustesse aastas. Vasakult paremale kujutavad tulbad tooresuremust invasiivsesse aspergilloosi, kroonilisse kopsu aspergilloosi, kandideemiasse ja invasiivsesse kandidoosi, pneumotsüsti-pneumooniasse, krüptokokk-meningiiti, AIDS-i dissemineerunud histoplasmoosi, talaromükoosi, mukormükoosi, koktsidioidmükoosi ja seentest põhjustatud astmasse tuhandetes. Hinnanguline tooresuremus seenhaigustesse aasta jooksul on 3 752 000 (Denning, 2024, modifitseeritud).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ehk pagaripärm on kõige laiemalt uuritud üherakuline eukarüoot ning ka esimene eukarüoot, kelle genoom 1996. aastal täielikult sekveneeriti (Nandy ja Srivastava, 2018; Johnston, 1996). *S. cerevisiae* on üks laiemalt kasutatavaid mikroorganisme biosünteesis, sealhulgas valkude ja metaboliitide tootmises tänu oma geneetilise manipulatsiooni hõlpsusele, kiirele kasvule, posttranslatsioonilise protsessimise mitmekesisusele ning võimele sekreteerida heteroloogseid valke natiivsel kujul (Mattanovich jt, 2014; Buckholz ja Gleeson, 1991). Ligi 30% inimorganismis haigusi tekitavatel geenidel leiduvad homoloogid pagaripärmis. Inimese ja *S. cerevisiae* DNA reparatsioonirajad on suuresti sarnased, 70% pagaripärmi reparatsioonivalkudest on inimrakkudes homoloogid ning ligikaudu 50% pärmi eluvajalikest geenidest on võimalik vahetada nende inimhomoloogi vastu (Vanderwaeren jt, 2022).

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* transkriptsiooni initsiatsioon

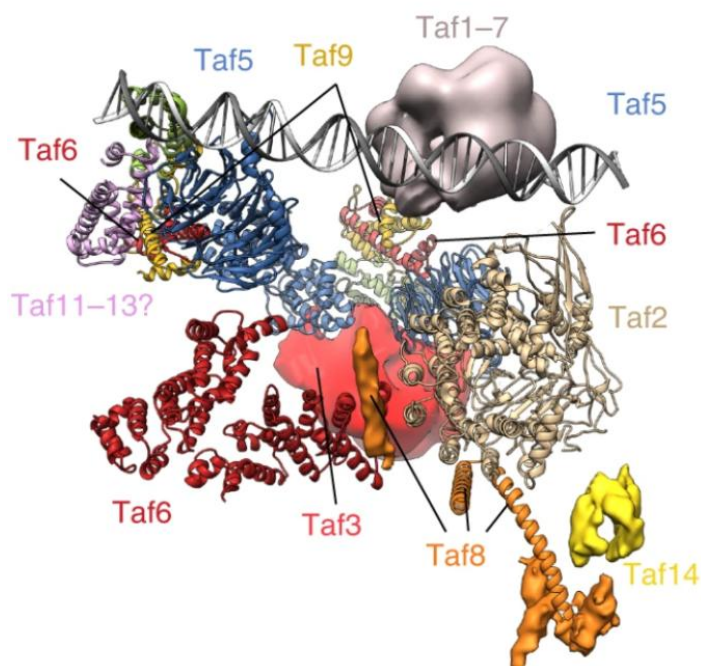
Saccharomyces cerevisiae RNA polümeraas-II vahendatud transkriptsiooni initsiatsioon vajab peale RNA polümeraasi ka basaalseid transkriptsioonifaktoreid, mis abistavad polümeraase RNA sünteesi etappides (Joonis 2). Transkriptsiooni initsiatsioon vajab pre-initsiatsiooni kompleksi (PIC) moodustumist promootoril, protsessi esimene etapp on transkriptsioonifaktor II D (TFIID) seondumine promootorile. Kottseente, sealhulgas *S. cerevisiae* TFIID sisaldab TATA-siduvat valku (TBP) ning 14 TAF-i. Esmalt seondub TFIID TATA-boxi ning initsiaator-elemendiga (Inr) ja järgnevalt seonduvad transkriptsioonifaktor II A (TFIIA) ja transkriptsioonifaktor II B (TFIIB), mis stabiliseerivad TFIID. Mediaatoriga kompleksis olev RNA polümeraas-II transporditakse promootorile. PIC-iga liituvad ka transkriptsioonifaktor II E (TFIIE), transkriptsioonifaktor II F (TFIIF) ja transkriptsioonifaktor II H (TFIIH), TFIIH avab oma helikaasse aktiivsusega promootoril DNA kaksikahelad ning võimaldab RNA polümeraas-II paigutamise DNA üksikahelale transkriptsiooni initsiatsiooniks. RNA sünteesi alustatakse avatud kompleksilt. Transkriptsiooni initsiatsiooni stabiilsuse saavutamiseks sünteesib polümeraas 10-15 nukleotiidi pikkuse RNA lõigu, TFIIH kinaas fosforüleerib RNA polümeraasi C-terminaalse osa (CTD) ja transkriptsioon läheb üle elongatsioonifaasi (Kuuse ja Maimets, 2023).



Joonis 2. RNA polümeraas-II vahendatud transkriptsiooni initsiatsioon. Helesinise ja erkkollasega on kujutatatud TFIID alaühikuid, mis seonduvad promootoril TATA-boxi (oranž) ja initsiaator-elementiga (roheline). Initsiatsiooni järgmises etapis liituvad kompleksiga TFIIA (punakaslilla) ja TFIIB (lilla) ning seejärel RNA polümeraas-II (punane). Viimasena liituvad TFIIF (heleroheline), TFIIE (tume tsüaan) ja TFIIH (helekollane). A- TFIIA, B- TFIIB, RNA pol II- RNA polümeraas-II, F- TFIIF, E- TFIIE, H- TFIIH, TATA- TATA-box, TBP- TATA-siduv valk, CTD- C-terminaalne osa, Inr- initsiaator-element. Joonis on modifitseeritud Martinez (2002) joonise järgi.

1.2.1.1 TFIID

TFIID ehk transkriptsioonifaktor II D on eukarüootsete valku kodeerivate geenide RNA polümeraas-II vahendatud transkriptsiooni üks keskseid regulaatoreid. TFIID üks alaühik, TBP tunneb ära spetsiifilise TATAA järjestuse promootoril ning alustab PIC-i assambleerimist *in vitro*. Madalamates eukarüootides positsioneerib TBP PIC-i transkriptsiooni alguskohast kindlale kaugusele, kuid kõrgemates eukarüootides osalevad transpordis ka TAF-id (Kolesnikova jt, 2018). Geenispetsiifiliste transkriptsioonifaktorite või koaktivaatorite aktivatsioon toimub läbi TFIID kompleksi ning vajab ka TAF-interaktsioone (Bhuiyan ja Timmers, 2019). Kottseente TFIID kompleksi eripära on Taf14, mida ei leidu teistes eukarüootsetes rakkudes (Joonis 3) (Kolesnikova jt, 2018).

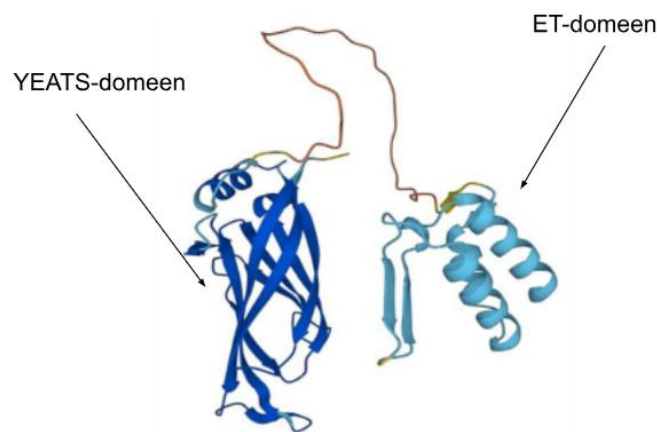


Joonis 3. TFIID-DNA interaktsioonid pärmis. *Volta Phase Plate* piltidest tuletatud kottseene *Komagataella phaffii* TFIID. Erinevate värvidega on märgistatud TFIID alaühikud Taf1-Taf14. Erkkollasega on kujutatud Taf14 alaühikut ja beežiga Taf2 alaühikut. Halliga on võrdluseks välja toodud inimese Taf1-7 konstrukti kristallstruktuur (Kolesnikova jt, 2018, modifitseeritud).

Taf14 *Saccharomyces cerevisiae*'s

Taf14 on kottseente TFIID kompleksi alaühik, mis kuulub seitsmesse transkriptsiooniga seotud valgukompleksi, nendeks on: TFIIF (transkriptsioonifaktor II F), INO80 kromatiini remodelleerimiskompleks, SWI/SNF kromatiini remodelleerimiskompleks, NuA3 histooni atsetüültransferaasi kompleks ja TFIID. Taf14 interakteerub TFIID kompleksiga läbi Taf2 alaühiku (Kolesnikova jt, 2018; *Saccharomyces Genome Database* kodulehekül, i.a; Feigerle ja Weil, 2016). Läbi nimetatud komplekside reguleerib Taf14 rakulisi protsesse nagu transkriptsiooni initsiatsioon, raku tsütoskeleti ümberorganiseerimine, pärmi metaboolne tsükkel ja vastus kuumasokile (Chen jt, 2020). *Saccharomyces cerevisiae* TAF14 deletsioonitüvi on tundlik välisele stressile, deletsioonitüves langeb kuumataluvus, kasvukiirus ja DNA kahjustuste parandamises oluliste valkude geenide ekspressioonis esineb defekte (Nemet jt, 2017; Feigerle ja Weil, 2016). Samuti on Taf14 oluline ka PIC-i stabiliseerimisel ning valgu puudumisel on kompleksi moodustumine häiritud (Peil jt, 2020). Taf14 on üks viiest algsest valgust, millel tuvastati YAF9, ENL, AFL, TAF14, SAS5 valkude domeen (YEATS-domeen) (Joonis 4). Taf14 YEATS-domeen funktsioneerib histooni lüsiini krotonülatsiooni lugejana ja on oluline transkriptsiooni regulaatsioonis ning ka pärmi DNA kahjustuste parandamisel tänu oma atsetüüllüsiini siduvale aktiivsusele. Domeeni funktsioon histooni

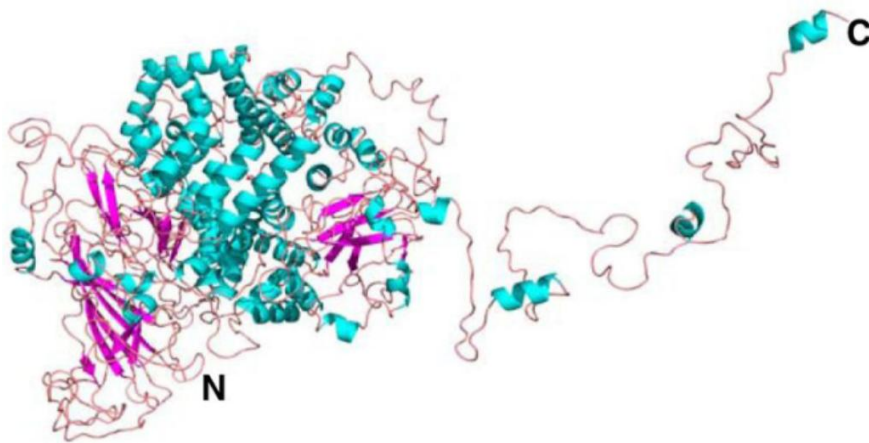
modifikatsioonide lugejana on evolutsiooniliselt kõrgelt konserveerunud (Hu ja Muntean, 2023; Andrews jt, 2016; Feigerle ja Weil, 2016). *S. cerevisiae*'s on kõigi YEATS-domeenide deletsioon rakule letaalne, kuid eluvõimekust on võimalik taastada ekspresseerides Taf14 valku YEATS-domeenita (Peil jt, 2020).



Joonis 4. *Saccharomyces cerevisiae* Taf14 valgu ehitus. AlphaFold keskkonnas koostatud valgustruktuur, kus on välja toodud Taf14 YEATS- ja ekstra-terminaalne (ET) domeen (Teder, 2023, modifitseeritud).

Taf2 *Saccharomyces cerevisiae*'s

Saccharomyces cerevisiae Taf2 on TFIID alaühik, mis osaleb RNA polümeraas-II vahendatud transkriptsiooni initsiatsioonis (String kodulehekül, i.a). Taf2 on evolutsiooniliselt konserveerunud pärmseentest inimeseni ning selle rolli TFIID kompleksi stabiliseerimises Inr sisaldavates promootorites on täheldatud mitmetes eukarüootides (Joonis 5). Taf2 inaktivatsioon läbi temperatuuritundlike mutantide loomise põhjustab rakkudes drastilist kasvudefekti, kuid võrreldes teiste TAF-ide inaktivatsiooniga mõjutab see suhteliselt väikese arvu geenide ekspressiooni (Cheng jt, 2024; Shen jt, 2003).



Joonis 5. *Saccharomyces cerevisiae* Taf2 valgu struktuuriennustus. Koostatud, kasutades ClustalW järjestuse joendamise algoritmi ja 3D struktuuri ennustamise programmi I-TASSER. Roosaga on välja toodud β -lehed, tsüaaniga α -heeliksid ja beežiga struktureerimata ahelad. C-terminus, N-terminus (Feigerle ja Weil, 2016, modifitseeritud).

Taf2 ja Taf14 seondumine *Saccharomyces cerevisiae*'s

Taf2 C-terminaalne osa on vajalik Taf14 sidumiseks TFIID kompleksi läbi Taf14 evolutsiooniliselt konserveerunud ekstra-terminaalse (ET) domeeni nii *in vitro* kui ka *in vivo*, ning selle domeeni kaotus või mutatsioon takistab kompleksi moodustumist ja põhjustab kasvuhäireid temperatuuritundlikes mutantides (Joonis 4; Joonis 5). Lisaks võib Taf14 valgu üleekspressioon osaliselt kompenseerida Taf2 valgu defekte, mis viitab Taf2 ja Taf14 tihedale funktsionaalsele seosele TFIID struktuuris ja aktiivsuses (Han jt, 2023; Feigerle ja Weil, 2016).

Taf14 ja Taf2 *Candida albicans*'is

Candida albicans kuulub kottseente hulka, kelle TFIID kompleks sisaldab Taf14 alaühikut N-terminaalse YEATS-domeeniga. Taf14 C-terminaalset osa blokeerides väheneb *C. albicans*'i virulentsus ning eluvõimekus. Valk on oluline rakuseina ja hüüfide struktuuri moodustumises ning *C. albicans*'i Taf14 YEATS-domeen tunneb ära histooni H3K9 krotonüleerimist, mida mõjutavad lühikese ahelaga rasvhapped nagu butüraat ja krotonaat. Need ühendid suurendavad histooni krotonüleerimise taset ja aktiveerivad stressivastuseid, mis aitavad rakkudel kohaneda keskkonnamuutustega. TAF14 geeni puudumine põhjustab häireid kromatiini ja geeniekspressiooni regulatsioonis ning geeni puudumisel muutub ka stressiga seotud geenide avaldumine (Wang jt, 2020).

C. albicans'i Taf2 valk on TFIID kompleksi eeldatav subühik, mis interakteerub Taf11-ga ning TBP-ga. HIV-positiivsetel oraalse kandidaasi patsientidel on tuvastatud TAF2 transkripti taseme tõusu (*Candida Genome Database* kodulehekül, i.a).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Candida albicans'i põhjustatud infektsioonid võivad kujuneda surmavaks. Hetkel kasutusel olevate kandidoosi vastaste ravimite vastu on täheldatud ravimiresistentsuse kasvu patogeenis ning ka ravimite kõrvalnähud võivad patsiendile eluohtlikud olla (Vitiello jt, 2023). Taf14 ja Taf2 interaktsioon on ravisihtmärgi hea kandidaat, kuna Taf14 valku ei leidu inimorganismis ning teistes kottseentes on näidatud temperatuuritundlikkust ja aeglast kasvu vastusena interaktsiooni inhibitsioonile (Feigerle ja Weil, 2016). Antud töö eesmärk oli teada saada, kas *C. albicans*'i Taf14 valk ja Taf2 valgu C-terminaalne osa (ah 1201-1425) seonduvad omavahel *Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemis, nagu seda on näidatud *Saccharomyces cerevisiae* Taf14 valgu ja Taf2 valgu C-terminaalse osa puhul. Mudelorganismina kasutati *S. cerevisiae*'t, sest *C. albicans* on oportunistlik patogeen, kellega töötamine võib inimesele potentsiaalselt ohtlik olla. Seondumise tuvastamine võimaldaks tulevikus välja töötada interaktsiooni inhibiitorid, aeglustamaks või ennetamaks *C. albicans*'i patogeenset kasvu inimorganismis.

Töö alaeesmärgid:

- *Candida albicans*'i Taf2 ja Taf14 seondumise struktuuriennustuse koostamine AlphaFold 3.0 keskkonnas
- *Candida albicans*'i TAF14 ja TAF2 C-terminaalse osa kloonimine pagaripärmi ekspressioonivektoris galaktoosiga indutseeritava promootori alla
- *Candida albicans*'i ja *Saccharomyces cerevisiae* Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalset osa ekspresseerivate pagaripärmitüvede loomine
- *Candida albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa ekspressiooni kontroll immunodefektsiooni eksperimendis
- *Candida albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa seondumise testimine ko-immunosadestamise katses

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 *Candida albicans*'i Taf2 ja Taf14 seondumise struktuuriennustus

Candida albicans'i Taf2 ja Taf14 seondumise visualiseerimiseks kasutati AlphaFold 3.0 platvormi. Samuti kasutati ChimeraX programmi, eristamaks Taf2 valguga C-terminaalse osa ja Taf14 valguga individuaalseid struktuure (Abramson jt, 2024) (Joonis 7). *C. albicans*'i valgujärjestused saadi *Candida Genome Database* koduleheküljelt ning *Saccharomyces cerevisiae* valgujärjestused *Saccharomyces Genome Database* koduleheküljelt.

2.2.2 Kasutatud plasmiidid ja tüved

Töös kasutatud plasmidi konstrueerimine

Töös kasutati algse plasmidina pBlueScript vektori baasil modifitseeritud plasmidi, mis sisaldab pärmi ADE2 markergeeni ja kahesuunalist GAL10 geeni promootorit (pBSAde2-Galprom1; 5877 ap). Töös uuritavad Taf2 ning Taf14 valkude geenid paljundati PCR-i abil Kromatiini töögrupi poolt eelnevalt valmistatud vastavat geeni ekspresseerivalt plasmiidilt (pRS413-3xFLAG-Canalb-TAF14 ehk HIS3 markergeeniga *Saccharomyces cerevisiae* ekspressioonivektor, mis sisaldab *Candida albicans*'i TAF14 geeni koos N-terminaalse 3xFLAG epitoopmärgisega) või telliti geenifragment (3x5E11Canalb-Taf2-Cterm) DNA fragemente sünteesivast firmast (Twist Bioscience™) ning kloneeriti pBSAde2-Galprom1 plasmidi. Kõik kloneerimise etapis kasutatud restriктаasid, restriktsoonipuhvrid ja ensüümid olid Thermo Fischer Scientific™ firmast. *C. albicans*'i TAF14 geeni kloneerimiseks kasutati XhoI ja KpnI restriктаase ja TAF2 geeni C-terminaalse osa (edaspidi TAF2-Cterm) kloneerimiseks Sall ja PstI restriктаase. Kloneerimisel kasutati *E. Coli* DH5α kompetentseid rakke. *C. albicans*'i TAF2-Cterm ekspresseerub koos N-terminaalse 3x5E11 epitoopmärgisega (785 ap) ja TAF14 koos N-terminaalse 3xFLAG epitoopmärgisega (786 ap).

Vektorisse pBSAde2-Galprom1 kloneeriti esmalt *C. albicans*'i TAF14 geen, seejärel *C. albicans*'i TAF2-Cterm. TAF14 geen paljundati üles PCR reaktsioonil plasmiidilt pRS413-3xFLAG-Canalb-TAF14 praimeritega, mille otstesse olid disainitud restriктаaside äratundmiskohad.

Plasmidi pBSAde2-Galprom1 restriктеeriti 40 µl -s, restriktsoonisegu sisaldas 10 µl plasmidi (2 µg), 4 µl 10x Tango puhvrit, 0,4 µl XhoI (10 U/µL) ja KpnI (10 U/µL) restriктаase ja 25,2 µl Milli-Q deioniseeritud vett (MQ vesi). Inserdi (Canalb-TAF14) lõikus teostati 20 µl-s, segu sisaldas 3 µl üles paljundatud TAF14 geeni DNA-d (10 ng/µl), 2 µl 10x Tango puhvrit, 0,2 µl XhoI (10 U/µL) ja KpnI (10 U/µL) restriктаase ja 14,6 µl MQ vett. Restriktsoonisegusid inkubeeriti 37°C juures üleöö.

Vektori pBSAde2-Galprom1-CaTAF14 (223 ng/ µl) ja *C. albicans*'i tellitud TAF2-Cterm (38,8 ng/µl) lõikus teostati SalI (10 U/µL) ja PstI (10 U/µL) restriктаasidega 10x O puhvris. *C. albicans*'i TAF2-Cterm järjestuse kloneerimiseks restriктеeriti TAF14 sisaldavat plasmidi (pBSAde2-Galprom1-CanalbTAF14) 40 µl -s, restriктаatsiooniseгу sisaldas 6 µl plasmidi (223 ng/µl), 8 µl 10x O puhvrit, 0,8 µl PstI ja SalI restriктаase ning 24,4 µl MQ vett. Inserti restriктаatsioon teostati 20 µl-s, kus 3 µl oli *C. albicans*'i TAF2-Cterm järjestus (38,8 ng/µl), 4 µl 10x O puhver, 0,4 µl SalI ja PstI restriктаase ning 12,2 µl MQ vett. Restriктаatsiooniseгуsid inkubeeriti 37°C üleöö ning järgmisel päeval teostati vektori lõikuse kontroll 1% agarosgeelil.

Pärast insertide restriктаiooni sadestati DNA. Insertidele lisati 180 µl 96% EtOH, 20 µl 3M NaAc ja 1 µl glükogeeni (20 mg/ml) sadenenud DNA paremaks visualiseerimiseks. Segu pandi üleöö -20°C külmkappi sadenema ja tsentrifuugiti Centrifuge 5415 R tsentrifuugis (Eppendorf™) 15 min 16 000 rcf. Supernatant eemaldati, sadenenud DNA-le lisati 500 µl külma 70% EtOH ja tsentrifuugiti 5 min 16 000 rcf. Supernatant eemaldati ning DNA-d kuivatati etanoolist 5 min 42°C. Insert lahustati 15 µl MQ vees ja kontsentratsioon mõõdeti 2000c spektrofotomeetriga (NanoDrop™).

Vektori lõikuse kontrolliks ja restriктеeritud plasmidi eraldamiseks geelist kasutati agarosgeelelektroforeesi. Lõigatud vektori maht oli 40 µl, millele lisati 8 µl 6xTritrack DNA värvi. Lõikamata vektori võeti 400 ng, millele lisati 10 µl 1xTAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8) ja 3 µl 6xTritrack DNA värvi. Geelile kanti ka 3 µl 1kb DNA Ladder'it. Geeli jookutati 1xTAE puhvris 25 min 130V juures. DNA visualiseeriti UV valguses 365 nm ning DNA eraldamiseks geelist kasutati DNA geelist puhastamise komplekti (GEL/PCR Purification Mini Kit; FavorPrep™) järgides tootja koostatud protokollit.

Restriктеeritud ja geelist puhastatud vektorisse TAF2-Cterm ja TAF14 geeni sisestamiseks kasutati ligatsiooni. *C. albicans*'i TAF14 geeni ligatsioonis algsesse plasmidi võeti inserti 33 ng ja restriктеeritud pBSAde2-Galprom1 plasmidi 100 ng. Ligatsioonisegusse lisati ka 1,5 µl T4 ligaasi (1 U/µl), 1,5 µl 10x T4 ligaasipuhvrit ja 1 µl MQ vett. Segu inkubeeriti 2 h 18°C.

C. albicans'i TAF2-Cterm ligatsioonis restriктеeritud pBSAde2-Galprom1-CaTAF14 plasmidi võeti inserti 6 ng ja restriктеeritud pBSAde2-Galprom1 plasmidi 60 ng. Ligatsioonisegusse lisati 1,5 µl T4 ligaasi, 1,5 µl T4 ligaasipuhvrit ja 1 µl MQ vett ja inkubeeriti 2 h 18°C.

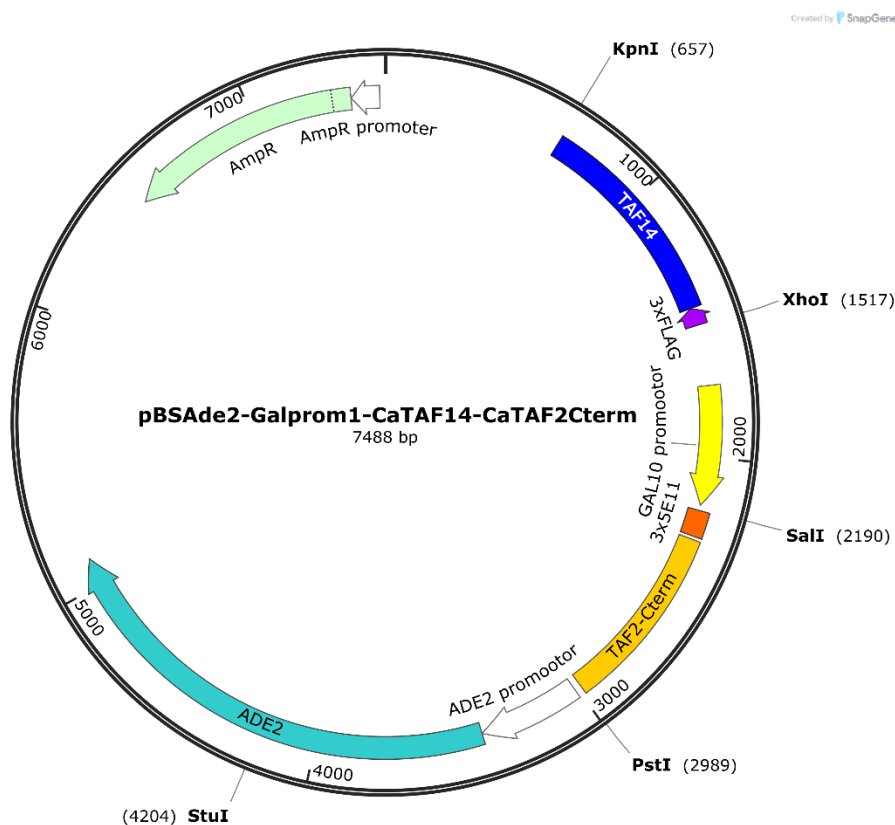
Transformatsiooniks bakterirakkudesse lisati 5 µl ligatsioonisegu 100 µl kompetentsetele *E. coli* DH5α rakkudele. Tuube inkubeeriti 15 min jääs ja 1 min 42°C. Segud tõsteti jääle, lisati 1 ml LB vedelsöödet (Tabel 2) ja inkubeeriti 45 min 37°C. Rakke tsentrifuugiti 3300 rcf 1 min ja

eemaldati supernatant, jättes alles 200 µl. Rakud suspendeeriti ja plaaditi klaaskuulide abil ampitsilliini sisaldavatele tassidele (AMP tardsööde; Tabel 2) ja inkubeeriti 37°C üleöö.

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasvatati transformatsioonil saadud bakterikolooniaid 2 ml ampitsilliini sisaldavas LB vedelsöötmes 37°C üleöö (Tabel 2) ja kasutati plasmiidieraldus minikomplekti (*Plasmid Extraction Mini Kit*; FavorPrep™), järgides tootja koostatud protokoll.

Koloonia-PCR meetodil positiivseks osutunud kolooniatest eraldatud plasmiidsed DNA-d saadeti sekveneerimisele. TAF14 integreerumise kontrolliks kasutati GALprom-ctrl-R praimerit ja TAF2-Cterm integreerumise kontrolliks Gal 1 F praimerit (Tabel 3). Lõplik plasmiid oli 7488 bp pikk (Joonis 6).

Katsetes kontrollina kasutatud *S. cerevisiae* TAF2-Cterm ja TAF14 geeni sisaldav plasmiid (pBSAde2-Galprom1-ScTAF14-ScTAF2Cterm) konstrueeriti varasemalt Kromatiini teadusgrupi liikme Kersti Kristjuhani poolt.



Joonis 6. *Candida albicans*'i TAF14 ja TAF2-Cterm gene sisaldava plasmiidi kaart. Joonisel on kujutatud plasmiidikaart, milles sisalduvad *C. albicans*'i TAF14 geen koos 3x-FLAG epitoopmärgisega, TAF2-Cterm geen 3x5E11 epitoopmärgisega, GAL10 promootor, ADE2 geen koos promootoriga, ampitsilliini resistentsusgeen promootoriga ning töös kasutatud restriksioonikohad. Joonis on koostatud SnapGene programmiga.

Töös kasutatud pärmitüve konstrueerimine

Taf14 valgu ja Taf2 valgu C-terminaalse osa (edaspidi Taf2-Cterm) seondumise uurimiseks konstrueeriti pärmitüvi, kus mõlema valgu ekspressiooni on võimalik indutseerida galaktoosiga. Selleks transformeeriti pagaripärmi lineariseeritud pBSAde2-Galprom1-CaTAF14-CaTAF2Cterm ja pBSAde2-Galprom1-ScTAF14-ScTAF2Cterm vektorid.

Pärmi transformatsiooniks kasutati tüve AKY 152 (Tabel 1), millel on adeniini, trüptofaani, leutsiini, lüsiini, histidiini ja uratsiili sünteesiks vajalikes geenides (ADE2, TRP1, LEU2, LYS2, HIS3, URA3) mutatsioonid. Tüve geenides sisalduvad mutatsioonid võimaldavad neid gene kasutada markergeenidena, sest rakud ei suuda kasvada söötmetel, millest on eelpool loetletud nukleotiidid ja aminohapped puudu. Homoloogse rekombinatsiooni mehhanism töötab läbiviidud katsetes eeldusel, et AKY 152 tüvi vahetab vigase ADE2 geeni välja konstrueeritud plasmidi funktsionaalse ADE2 geeni vastu ja inkorporeerib ADE2 lookusesse ka TAF2-Cterm ja TAF14 geeni. Homoloogse rekombinatsiooni toimumiseks lineariseeriti konstrueeritud plasmiidid ADE2 geenis asuva StuI restriksioonikoha abil. Kõik pärmitüve konstrueerimise etapis kasutatud restriктаasid, restriksioonipuhvrid ja ensüümid olid Thermo Fischer Scientific™ firmast.

Restriksioon teostati 30 µl-s: *Saccharomyces cerevisiae* geene sisaldava plasmidi lõikamiseks kasutati 20 µl MQ vett, 3 µl B puhvrit, 2 µl StuI (Eco 147I) (10 U/µl) restriктаasi ja 1 µg plasmidi. *Candida albicans*'i järjestusi sisaldava plasmidi restriksioonisegus oli 15 µl MQ vett, 3 µl B puhvrit, 2 µl StuI restriктаasi ja 1 µg plasmidi.

Tüvi AKY 152 pandi kasvama 20 ml glükoosiga YPD vedelsöötmesse (Tabel 2) 200 rpm 30°C, üleöö Excella E25 (New Brunswick™) inkubaatorloksutisse. Pärmikultuuri lahjendati viis korda ja kasvatati 4 h. 3 ml vedelkultuuri kanti kahte 1,5 ml tuubi ja tsentrifuugiti 2300 rcf 2 min. Supernatant eemaldati, sade suspenderiti 500 µl LiOAc (0,1 M)+ 1x TE lahuses (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1 mM EDTA) ja tsentrifuugiti 2300 rcf 2 min. Eemaldati supernatant, rakusade suspendeeriti 40 µl -s LiOAc (0,1 M)+ 1x TE lahuses ja lisati 4 µl denatureeritud kandja-DNA-d (2 mg/ml). 1,5 ml tuubidesse pipeteeriti 10 µl restrikteeritud plasmiidset DNA-d. Tuube inkubeeriti 15 min toatemperatuuril, lisati 30 µl 100% DMSO, vortexiti ja inkubeeriti 42°C 10 min. Rakke hoiti jääl 1 min ja fuugiti 3 min 0,8 rcf. Supernatant eemaldati, rakud suspendeeriti 150 µl-s MQ vees ja plaaditi -ADE tardsöötmele (Tabel 2). Rakke kasvatati 4 päeva 30°C inkubatsioonikapis.

Tabel 1. Kasutatud tüved.

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
W303 , AKY 152	MAT A, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-101 lys2D can1-100</i>	Saadud Jesper Svjestrupi töögrupilt
AKY 2911	W303, MAT A, Sc-3xFLAG-Taf14,Sc-3xF12-Taf2-C-term:: ADE2	Valminud käesoleva töö käigus
AKY 2935	W303, MAT A, Canalb-3xFLAG-Taf14,Canalb-3xF12-Taf2-C-term:: ADE2	Valminud käesoleva töö käigus
AKY 2432	W303, MAT A, Sc-3xFLAG-Taf14	Kromatiini uurimisgrupp

Tabel 2. Kasutatud söötmed.

Sööde	Koostis
YPD vedelsööde	10 g/l pärmiekstrakt; 20 g/l mükoloogiline peptoon; MQ vesi. Galaktoosi või glükoosi sisaldavale söötmele lisati vastavalt 20 g/l lahust.
-ADE tardsööde	Agar 20 g/l; 20 g/l glükoos; MQ vesi; aminohapped: lüsiin 0,08 g/l, leutsiin 0,08 g/l, trüptofaan 0,08 g/l, uratsiil 0,2 g/l, histidiin 0,08 g/l
LB vedelsööde	10 g/l trüptoon; 5 g/l pärmiekstrakt; 10 g/l NaCl. Ampitsilliini sisaldavale söötmele lisati 100 µg/ml ampitsilliini.
AMP tardsööde	20 g/l agar; 10 g/l trüptoon; 5 g/l pärmiekstrakt; 10 g/l NaCl ja 100 µg/ml ampitsilliin.

2.2.3 PCR

Polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR meetodit (*polymerase chain reaction*) kasutati töös plasmidselt DNA-lt kloonimiseks vajaliku järjestuse ülespaljundamiseks, restriksiooni kontrolliks ja konstrueeritud plasmiidide õigsuse kontrollimiseks (koloonia-PCR).

PCR segu *Candida albicans*'i TAF14 geeni üles paljundamiseks pRS413-3xFLAG-Canalb-TAF14 plasmiidilt: 12 µl MQ vett, 4 µl 5x *Phusion Green HF* puhvrit (Thermo Fischer Scientific™), 2 µl XhoI-3xFLAG-F ja KpnI_CanAlb-TAF14-R praimereid (10 µmol/µl;

Microsynth™), 10 ng plasmiidset DNA-d, 2 µl 2 mM dNTP ja 1 µl *Phusion DNA Polymerase* (2 U/µL; Thermo Fischer Scientific™).

Bakterikolooniatesse vektori integreerumise kontrolliks valmistatud PCR: 2 µl *5x Firepol Mastermix* (SolisBiodyne™), 0,2 µl praimereid (10 µmol/µl; Microsynth™) (TAF14 integratsiooni kontrolliks XhoI-3xFLAG-F ja KpnI_CanAlb-TAF14-R praimereid ja TAF2-Cterm kontrolliks Gal 1 F ja pBlueAde-sekv-R praimerid) (Tabel 3) ja 7,6 µl MQ vett. PCR segus suspendeeriti hambatikuga transformatsioonil saadud kolooniad.

Plasmiidset DNA-lt TAF14 geeni üles paljundamiseks kasutati järgmist PCR programmi: algne denaturatsioon 5 min, 98 °C; 33 tsükli: denaturatsioon 20 sek, 96 °C; praimerite seondumine 20 sek, 55 °C; süntees 1 min, 72 °C. Järelsüntees 5 min, 72 °C. Reaktsioon viidi läbi 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™) termotsükleriga.

Bakterikolooniatesse vektori integreerumise kontrolliks PCR reaktsioonil kasutati järgmist programmi: algne denaturatsioon 5 min, 98 °C; 35 tsükli: denaturatsioon 20 sek, 96 °C; praimerite seondumine 20 sek, 55 °C; süntees 1 min, 72 °C. Järelsüntees 5 min, 72 °C. Reaktsioon viidi läbi 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™) termotsükleriga.

Tabel 3. Kasutatud praimerid ja nende järjestused.

Praimeri nimetus	Number andmebaasis	Praimeri järjestus
XhoI-3xFLAG-F	1834	5'- ATACTCGAGATGGACTACAAAGACCATGACGGT- 3'
KpnI_CanAlb-TAF14-R	1843	5'-ATAGGTACCTTAAGCTTCACCAGTGTGTTT TTTCACG-3'
pBlueAde-sekv-R	1298	5'-TACAAAATTCTCGGCTTCTCACTA-3'
GALprom-ctrl-R	1830	5'-TGATTATTAACTTCTTTGCGTCCATC-3'
Gal 1 F	1666	5'-CTTCTTATTCAAATGTCATAAAAGTATC-3'

2.2.4 Agarosgeelelektroforees

Töös läbiviidud PCR reaktsiooni produktide suurusi kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga. Valmistati 1% agarosgeel: 1xTAE puhver (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8), LE agaros (Seakem™) ja DNA tuvastamiseks lisati etiidiumbromiidi (EtBr; 0,1 µg/ml).

Inserdi integreerumise kontrolliks kasutati PCR meetodil üles paljundatud plasmiidset DNA-d. DNA pipeteeriti 10 µl kaupa kaevukestesse ja vektori suuruse kontrolliks kanti geelile 3 µl *1 kb*

DNA Ladder®it (80 ng/μl; Thermo Fischer Scientific™). Geeli jooksutati 25 min 125V juures ja vaadeldi UV lambi all 365 nm juures.

2.2.5 Immuunodetektsioon (*western blot*)

Valkude immuunodetektsiooni kasutati konstrueeritud pärmitüves valkude ekspressiooni kontrolliks ja ko-immunosadestamise tulemuste visualiseerimiseks.

Western blot proovide valmistamine: transformatsioonil saadud pärmikolooniad külvasi 10 ml 2% galaktoosiga või 2% glükoosiga YPD vedelsöötmesse (Tabel 2) ja kasvatati 10 h 30°C 200 rpm Excella E25 (New Brunswick™) inkubaatorloksutil, 2 ml vedelkultuuri pipeteeriti 2 ml tuubi ja tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf 4°C. Supernatant eemaldati ja rakke pesti 1 ml külma MQ veega. Sade suspendeeriti 1 ml külmas 2M LiOAc lahuses, hoiti 5 min jääl ja tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf 4°C. Sade suspendeeriti 1 ml 0,4M NaOH lahuses, inkubeeriti 5 min jääl ja tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf 4°C juures.

Sade suspendeeriti 50 μl-s 2x SDS proovipuhvril (4% SDS; 20% glütserool; 0,01% bromofenool sinine; 100 mM Tris pH 6,8; 100 mM β-merkaptotetanool). Lüsaati sonikeeriti 30 sek Bioruptor Standard (Diagenode™) sonikaatoris kõrgeima sagedusega ja inkubeeriti 5 min 95°C juures. Lüsaati vortexiti 10 sek, tsentrifuugiti 5 min 16 000 rcf, tõsteti uude 1,5 ml tuubi ja hoiustati -20°C.

Valkude ekspressiooni kontrolliks ja ko-immunosadestamise tulemuste visualiseerimiseks kasutati 15% polüakrüülamiidgeele. Valkude ülekande geelilt PVDF membraanile teostati 1h 15V Power Station 300 (Labnet™) poolkuiva ülekande masinas, membraane blokeeriti 5% lõssilahuses (lõssipulber; 1xPBS; 0,05% Tween20) ning valgusignaalide visualiseerimiseks kanti membraanile 1:1 suhtes luminooli ja peroksiidi lahust (*Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*; Millipore™). 3xFLAG epitoopmärgisega Taf14 valgu ekspressiooni vaatlemiseks kasutati 1:10000 anti-FLAG M2 antikeha (1 mg/ml; Sigma-Aldrich™), 3x5E11 epitoopmärgisega Taf2-Cterm ekspressiooni vaatlemiseks 1:2000 5E11 antikeha (1 mg/ml; Icosagen™). Kemoluminessentsireaktsiooni läbiviimiseks kasutati 1:10000 lahjendusega hiire valke äratundvat määrõika peroksüdaasiga (HRP) konjugeeritud sekundaarset antikeha. Valgusignaalide visualiseerimiseks kasutati ChemiDoc MP (Bio-Rad™) masinat ja ImageLab6 tarkvara.

2.2.6 Ko-immunosadestamise proovide valmistamine

Ko-immunosadestamise proovide tegemiseks kasvatati pärmirakke eelnevalt 13 h 50 ml 2% galaktoosi või glükoosiga YPD vedelsöötmes (Tabel 2). Üleöö kasvanud kultuurid valati 50 ml tuubidesse ja tsentrifuugiti Universal 320R (Hettich™) tsentrifuugis 3 min 2300 rcf. Sade

suspendeeriti 30 ml MQ vees, tsentrifuugiti 5 min 2300 rcf ja supernatant eemaldati. Kõik järgnevad etapid sooritati jääl. Sade suspendeeriti 1 ml lüüsilahuses [1xPuhver G (50mM HEPES puhver pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; MQ vesi); 0,5% Triton X-100; 10% glütserool; 0,5mM DTT; 1x proteaasi inhibiitorite kokteil; MQ vesi] ja iga proov jagati kahte 1,5 ml *safelock* tuubi. Rakususpensioonile lisati 0,5 mm klaaskuulid (BioSpec Products™) ja pandi Disruptor Genie väristajasse (Scientific Industries™) 15 min 4°C. Tuubide põhja tehti naaskliga auk ja *safelock* tuubid asetati 2 ml tuubidesse. Lüsaati tsentrifuugiti 1 min 400 rcf ja iga proovi 2 ml tuubide sisud tõsteti kokku uude 1,5 ml tuubi. Tuube tsentrifuugiti 5 min 16 000 rcf. Supernatandist eraldati 20 µl *input*-prooviks ja hoiti -20°C. Ülejäänud lüsaat tõsteti 1,5 ml tuubi ja kasutati ko-immunosadestamiseks. Inkubatsioon antikehadega erines olenevalt sadestatava valguga afiinsusmärgisest.

3x5E11-afiinsusmärgisega valkude sadestamiseks lisati rakulüsaadile 2 µl 5E11 antikeha ja proove inkubeeriti 1,5 h 4°C Multi RS-60 rotaatoril (Biosan™). Inkubatsiooni ajal valmistati ette proteiin-A-ga seotud sefarooskerakesed (*rProtein A Sepharose™ Fast Flow*; Cytiva™). Iga proovi kohta pipeteeriti 1,5 ml tuubi 30 µl sefarooskerakesi ja tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf, supernatant eemaldati. Kerakesed suspendeeriti 1 ml-s lüüsilahuses ja tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf. Pesu korrati veel neli korda 0,5 ml lüüsilahusega iga pesu kohta. Kerakesed suspendeeriti 1 ml lüüsilahuses ja igale ko-immunosadestamise proovile lisati 100 µl kerasid.

3xFLAG-afiinsusmärgisega valkude sadestamiseks kasutati iga proovi kohta 30 µl anti-FLAG agaroskerakesi (*Agarose Anti-DDDDK tag (Binds to FLAG® tag sequence) antibody*; Abcam™). Kerakesed pesti nagu varasemalt kirjeldatud. Pestud kerakestest lisati igale ko-immunosadestamise proovile 100 µl ja proove koos kerakestega inkubeeriti 2 h 4°C juures rotaatoril.

Proove tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf, agaroskerakesed sadenesid tuubi põhja, supernatant eemaldati. Kerakesi pesti kolm korda 1 ml jääkülma WB1 lahusega (1xPuhver G; 0,5% Triton X-100; 5% glütserool; 0,5mM DTT; MQ vesi) ja üks kord WB2-ga (1xPuhver G; 5% glütserool; MQ vesi), 1 min 2300 rcf

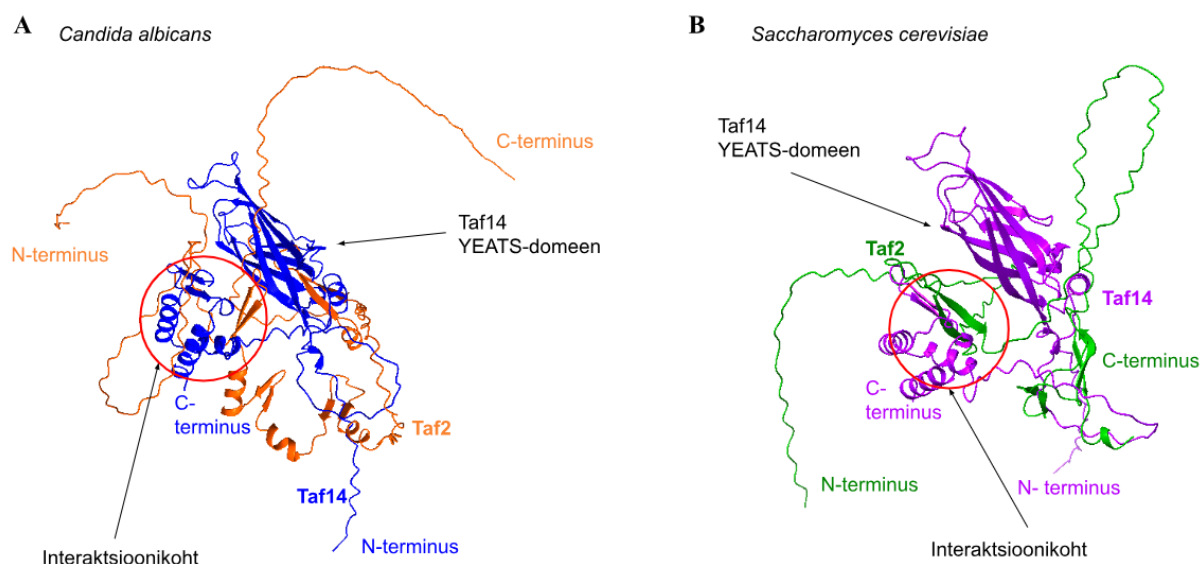
Ko-immunosadestamise kerakesi suspendeeriti 30 µl 2x SDS proovilahuses (4% SDS; 20% glütserool; 0,01% bromofenool sinine; 100 mM Tris pH 6,8; 100 mM β-merkaptotoetanool), *input*-proove suspendeeriti 20 µl 2x SDS proovilahuses, proove inkubeeriti 5 min 95°C, vortexiti 10 sek ja tsentrifuugiti 1 min 2300 rcf. Supernatant tõsteti uude 1,5 ml tuubi ja jooksutati valkude immuunodekteksiooniks 15% polüakrüülamiidgeelil. Geelile kanti 15 µl uuritavaid proove ja 3 µl *PrecisionPlus Protein Dual Standards Protein Ladder* (Bio-Rad™).

2.3 Tulemused

Candida albicans'i põhjustatud infektsioonid võivad hõlmata kõiki organeid inimorganismis. Patogeeni resistentsus hetkel kasutusel olevate seeninfektsioonide vastaste ravimite vastu on tõusmas, mistõttu on tekkinud vajadus uute seenhaiguste vastaste ravisihtmärkide järele. Käesolev töö keskendub Taf14 valgule ja selle interaktsioonile Taf2 valgu C-terminaalse osaga kui potentsiaalsele ravisihtmärgile. Varasemast on teada, et *Saccharomyces cerevisiae* Taf2 valgu C-terminaalne osa ja Taf14 valk seonduvad üksteisega, kuid *C. albicans*'i puhul oli see hüpotees kinnitamata. Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada, kas *C. albicans*'i Taf2 valgu C-terminaalne osa ja Taf14 valk seonduvad *S. cerevisiae* mudelsüsteemis.

2.3.1 Struktuuriennustused näitavad *Candida albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa seondumist

Pagaripärmis on näidatud, et Taf14 ja Taf2-Cterm valgud on võimelised omavahel seonduma. Käesolevas töös sooviti teada saada, kas ka *Candida albicans*'i Taf14 valk ja Taf2-Cterm võivad seonduda. AlphaFold 3.0 serveris koostati valkude interaktsiooni struktuuriennustus, et võrrelda omavahel *C. albicans*'i ja *Saccharomyces cerevisiae* seondunud Taf2-Cterm ja Taf14 komplekside struktuure ning hinnata eri regioonide omavahelise seondumise tõenäosust. Samuti kasutati ChimeraX programmi, eristamaks Taf2-Cterm ja Taf14 valgu individuaalseid struktuure. *S. cerevisiae* ja *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valkude seondumise struktuuriennustused sarnanevad omavahel. Nii *C. albicans*'i kui *S. cerevisiae* Taf14 N-terminaalses osas on kaheksast β -lehtedest formeerunud YEATS-domeen (Joonis 4), sellele järgneb struktureerimata ala ja kolm α -heeliksit valgu C-terminuses. Taf2-Cterm osa puhul on ennustuse usaldusväärsus madalam kui Taf14 oma (Lisa 1). Mõlemas struktuuris on välja toodud Taf14 C-terminaalsed ET domeeni α -heeliksid ja β -lehed ja Taf2-Cterm β -lehed, mille puhul on näidatud interaktsiooni *S. cerevisiae*'s (Joonis 7). *C. albicans*'i valkude interaktsiooni struktuuriennustusel asuvad nimetatud *S. cerevisiae* struktuuride analoogid lähestikku. Konstrueeritud valgustruktuuride sarnasuse alusel tundus tõenäoline, et *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valk on samuti võimelised omavahel seonduma. Kuna käesolev uurimistöö on aluseks *C. albicans*'i valkude interaktsiooni inhibitsiooni testsüsteemile, otsustati luua pagaripärmitüvi, mis ekspresseerib *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valku.

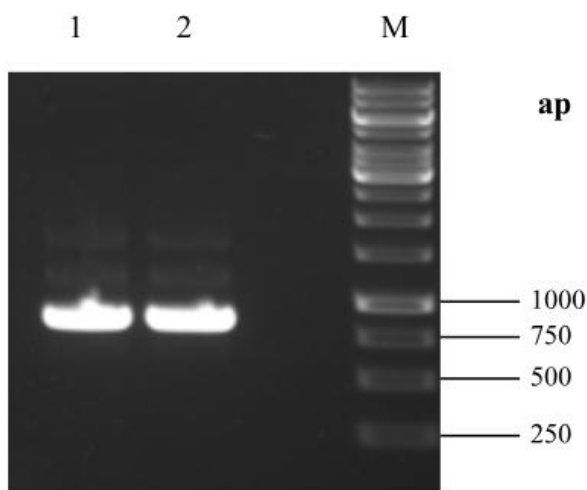


Joonis 7. *Candida albicans*'i ja *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni ennustus. Joonisel on valkude N- ja C-terminused, β -lehtedest koosnevad Taf14 YEATS-domeenid ning Taf2-Cterm ja Taf14 valgu eeldatavad interaktsioonikohad. (A) *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni ennustus. Sinisega on joonisel märgitud *C. albicans*'i Taf14 valk ja oranžiga *C. albicans*'i Taf2-Cterm. (B) *S. cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni ennustus. Lillaga on joonisel märgitud *S. cerevisiae* Taf14 valk ja rohelisega *S. cerevisiae* Taf2-Cterm. Joonised on koostatud AlphaFold 3.0 serveris ja modifitseeritud ChimeraX programmis.

2.3.2 *Candida albicans*'i Taf14 valku ja Taf2 C-terminaalset osa ekspresseeriva plasmidi konstrueerimine

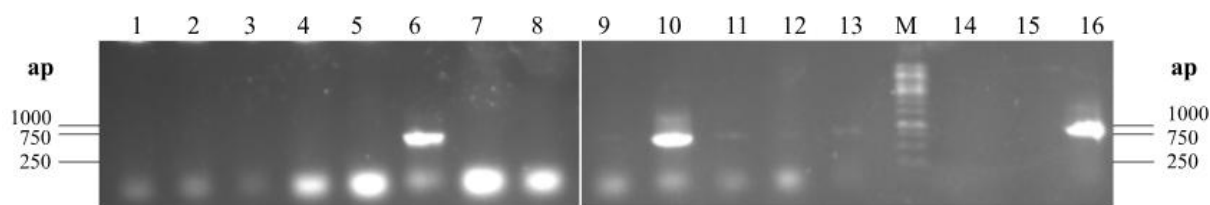
Candida albicans'i TAF2-Cterm ja TAF14 geeni sisaldava plasmidi konstrueerimise eesmärk oli saada plasmid, mis integreeruks homoloogse rekombinatsiooni abil pagaripärmi ADE2 lookusesse ning võimaldaks *C. albicans*'i valkude ekspressiooni *Saccharomyces cerevisiae*'s.

Plasmid loodi pBSAde2-Galprom1 alusel, mis sisaldab ADE2 markergeeni ja kahesuunalist GAL10 promootorit. GAL10 promootor võimaldas hilisemates katsetes rakendada galaktoosi induktsiooni ehk protsessi, kus pärm ekspresseerib GAL10 promootori kontrolli all olevaid geene vaid galaktoosi juuresolekul. Kloneerimise protsess hõlmas esmalt 3xFLAG epitoopmärgisega TAF14 geeni ülespaljundamist pRS413-3xFLAG-Canalb-TAF14 plasmidilt, kasutades PCR primereid, mille otstesse olid disainitud XhoI ja KpnI restriктаaside äratundmiskohad (Joonis 8). Fragmendi eeldatav suurus on 860 ap, joonisel oli näha signaal 750 ja 1000 ap vahel, seega oli paljundatud DNA-fragment eeldatud suurusega.



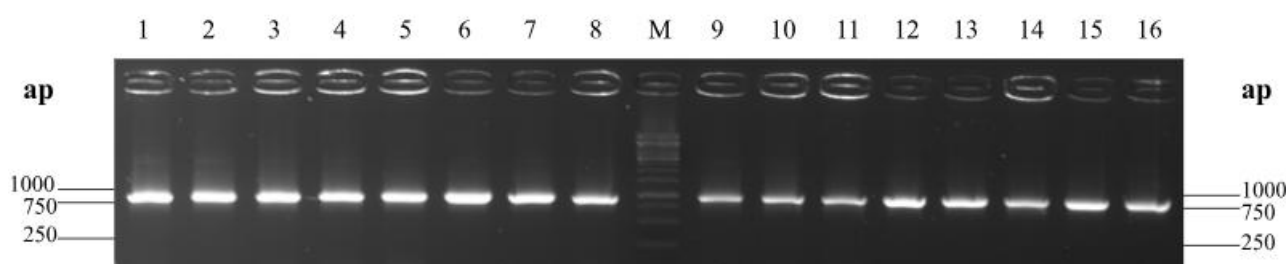
Joonis 8. *Candida albicans*'i 3xFLAG-TAF14 fragmendi üles paljundamine PCR meetodiga. Radadel 1 ja 2 on *C. albicans*'i 3xFLAG-TAF14, plasmiidilt pRS413-3xFLAG-Canalb-TAF14 PCR-il üles paljundatud XhoI-3xFLAG-F ja KpnI_CanAlb-TAF14-R praimeritega. Proovid on lahutatud 1% agaros-geelelektroforeesil. Fragmendi eeldatav suurus on 860 ap. Rajal M on DNA suurusmarker (Thermo Fischer Scientific™ *1kb DNA Ladder*). ap- aluspaar.

Kloneerimise läbiviimiseks lineariseeriti pBSAde2-Galprom1 vektor ning PCR-i produkti lõigati XhoI ja KpnI restriктаasidega ja ligeeriti omavahel. Saadud plasmiid (pBSAde2-Galprom1-CaTAF14) transformeeriti *E. coli* DH5α rakkudesse. Transformatsiooni ja kloneerimise õnnestumist kontrolliti koloonia-PCR meetodil ning visualiseeriti agarosgeelelektroforeesil (Joonis 9). Joonisel 9 oli radadel 6, 9, 10, 11, 12, 13 ja 16 näha PCR signaali 750 ja 1000 ap vahel ning need DNA fragmendid olid eeldatud suurusega (860 ap). Tugevama PCR-signaali andnud kolooniatest (6, 10, 16) eraldati aluselise lüüsi meetodil plasmiidne DNA ja saadeti sekveneerimisele praimeriga GALprom-ctrl-R (Tabel 3). Kõik kolm sekveneeritud plasmidi sisaldasid oodatud nukleotiidset järjestust. Edasistes katsetes kasutati rajal 16 signaali andnud plasmidi.



Joonis 9. *Candida albicans*'i TAF14 geeni olemasolu kontroll plasmiidis koloonia-PCR meetodil. Radadel 1—16 on *E. coli* transformantides kontrollitud TAF14 geeni olemasolu XhoI-3xFLAG-F ja KpnI_CanAlb-TAF14-R praimeritega. *C. albicans*'i 3xFLAG-TAF14 eeldatav suurus on 860 ap. PCR produktid on lahutatud 1% agaros-geelelektroforeesil. Rajal M on DNA suurusmarker (Thermo Fischer Scientific™ *1kb DNA Ladder*). ap- aluspaar.

C. albicans'i TAF2 C-terminaalset osa (aminohapped 1201-1425) ekspresseeriv DNA fragment koos N-terminalse 3x5E11 epitoopmärgise ning 5' ja 3' restriктаaside äratundmiskohtadega telliti kommertsiaalselt valmissünteesitult. Tellitud fragmendi kloneerimiseks valminud pBSAde2-Galprom1-CaTAF14 plasmidi restrikteeriti plasmidi ja fragmenti SalI ja PstI restriктаasidega ning ligeeriti omavahel. Ligeeritud vektor transformeeriti *E. coli* DH5 α rakkudesse. Kloneerimise õnnestumist kontrolliti koloonia-PCR meetodil ning visualiseeriti agarosgeelelektroforeesil (Joonis 10). *C. albicans*'i TAF2-Cterm järjestust sisaldava fragmendi eeldatav suurus on 993 ap. Joonisel oli radadel 1—16 näha signaali 750 ja 1000 ap vahel, seega olid kõik testitud kolooniade plasmiididelt üles paljundatud DNA-fragmendid eeldatud suurusega. Radadel 7, 15 ja 16 olevate kolooniade plasmiidid DNA-d saadeti sekveneerimisele Gal 1 F praimeriga, kõik sekveneeritud plasmiidid sisaldasid õiget nukleotiidset järjestust. Edasistes katsetes kasutati kloneerimisel rajal 15 signaali andnud plasmidi. Lõplik konstrueeritud plasmiid (pBSAde2-Galprom1-CaTAF14-CaTAF2Cterm) oli 7488 ap pikk (Joonis 6).

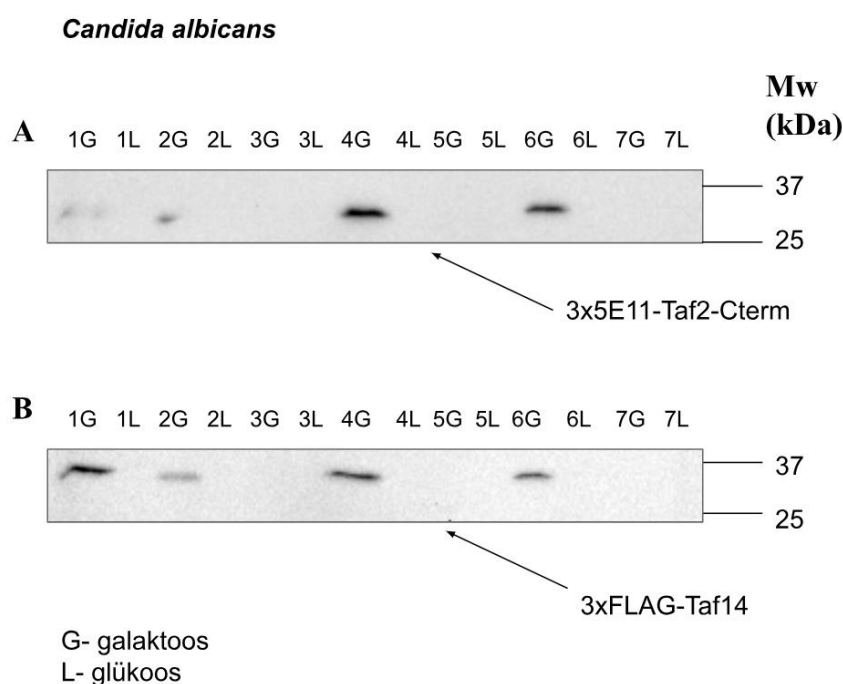


Joonis 10. *Candida albicans*'i TAF2-Cterm olemasolu kontroll plasmiidis koloonia-PCR meetodil. Radadel 1—16 on transformatsioonil saadud *E. coli* kolooniates TAF2-Cterm geeni olemasolu kontrollitud pBlueAde-sekv-R ja Gal 1 F praimeritega. Fragmendi eeldatav suurus on 993 ap. Kolooniade PCR produktid on lahutatud 1% agarosgeelil geelektroforeesil. Rajal M on DNA suurusmarker (Thermo Fischer Scientific™ 1kb DNA Ladder). ap- aluspaar.

2.3.3 *Candida albicans*'i Taf14 valku ja Taf2 C-terminaalset osa ekspresseeriva pagaripärmi tüve konstrueerimine

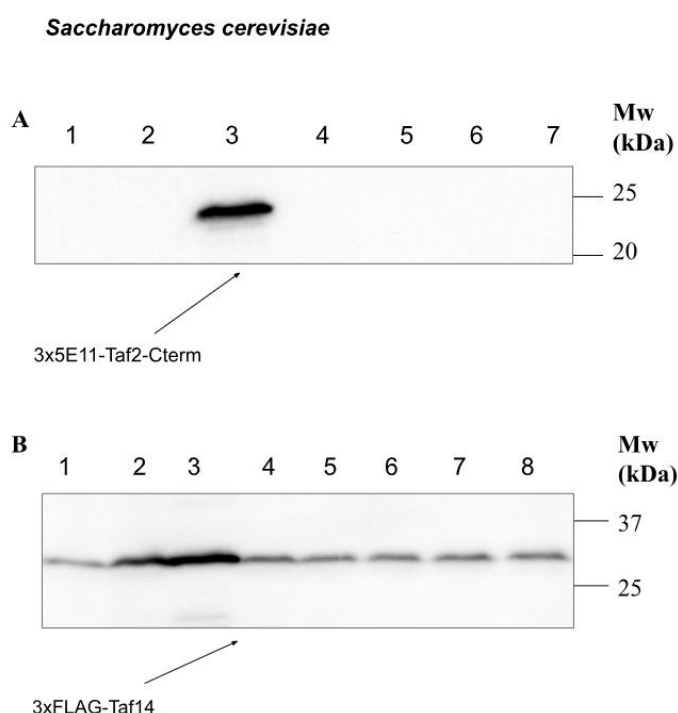
Valkude seondumise kontrolliks oli vaja luua mudelsüsteem, kus pagaripärmis ekspresseeruks *Candida albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valk. Selleks transformeeriti AKY152 pärmitüvesse konstrueeritud plasmiid pBSAde2-Galprom1-CaTAF14-CaTAF2Cterm, mis lineariseeriti ADE2 markergeenis olevat StuI restriksioonikohta kasutades. Samaaegselt konstrueeriti ka kontrolltüvi, milles ekspresseeruks samuti galaktoosiga indutseeritavad *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valk. Selle tarbeks transformeeriti AKY 152 tüvesse StuI-ga restrikteeritud pBSAde2-Galprom1-ScTAF14-ScTAF2Cterm plasmiid. Lineariseeritud

plasmiidid asendasid AKY 152 mutantse ADE2 geeni homoloogse rekombinatsiooni teel ning inkorporeerisid pärmi genoomi *C. albicans*'i või *S. cerevisiae* TAF2-Cterm ja TAF14 geeni koos GAL10 promootoriga. Rekombinantsed pärmikolooniad selekteeriti -ADE tardsöötmel. Tardsöötmel kasvanud kolooniate puhul sooviti teada saada, kas neis ekspresseeruvad galaktoosiga indutseeritavad epitoopmärgistega valgud. Selleks kasvatati rakke galaktoosi või glükoosi sisaldavas vedelsöötmes ja kontrolliti valguekspressiooni *western blot* meetodil. *C. albicans*'i Taf2-Cterm eeldatav suurus koos 3x5E11 epitoopmärgisega on 29,96 kDa ning Taf14 valgu eeldatav suurus koos 3xFLAG epitoopmärgisega on 31,81 kDa. 3x5E11-Taf2-Cterm 5E11 antikehaga detekteerimisel oli galaktoosis indutseeritud kolooniatel 1, 2, 4 ja 6 tuvastatav signaal 25 ja 37 kDa vahel, seega olid nende pärmikolooniate valgusignaalid eeldatava suurusega ja ekspresseerisid Taf2-Cterm (Joonis 11A). 3xFLAG-Taf14 antikehaga anti-FLAG detekteerides oli galaktoosis indutseeritud kolooniatel 1, 2, 4 ja 6 tuvastatav signaal 25 ja 37 kDa vahel, seega olid nende pärmikolooniate valgusignaalid eeldatava suurusega ja ekspresseerisid Taf14 valku (Joonis 11B).



Joonis 11. *Candida albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valgu ekspressiooni kontroll pagaripärmi rakkudes *western blot* meetodil. 3x5E11-Taf2-Cterm (A) ja 3xFLAG-Taf14 (B) ekspressiooni kontrolliks kasvatati transformatsioonil saadud kolooniaid üleöö galaktoosiga (2%; rajad 1G, 2G, 3G, 4G, 5G, 6G ja 7G) ja glükoosiga (2%; rajad 1L, 2L, 3L, 4L, 5L, 6L ja 7L) vedelsöötmes. Proove jooksutati 15% polüakrüülamiid-geelis. *C. albicans*'i 3x5E11-Taf2-Cterm eeldatav suurus on 29,96 kDa ja 3xFLAG-Taf14 eeldatav suurus on 31,81 kDa. Suurusmarkerina oli kasutusel *PrecisionPlus Protein Dual Standards Protein Ladder* (Bio-Rad™). Mw- molekulaarmass, kDa- kilodalton.

S. cerevisiae Taf2-Cterm eeldatav suurus koos 3x5E11 epitoopmärgisega on 21,96 kDa ning Taf14 valgu eeldatav suurus koos 3xFLAG epitoopmärgisega on 30,23 kDa. 3x5E11-Taf2-Cterm 5E11 antikehaga detekteerides oli galaktoosis indutseeritud kolooniaal 3 tuvastatav signaal 20 ja 25 kDa vahel. Selle pärmikoloonia valgusignaal oli eeldatava suurusega ja ekspresseeris Taf2-Cterm (Joonis 12A). 3xFLAG-Taf14 anti-FLAG antikehaga detekteerides oli galaktoosis indutseeritud kolooniatel 1—8 tuvastatav signaal 25 ja 37 kDa vahel. *S. cerevisiae* pärmikolooniade 3xFLAG-Taf14 valgusignaalid olid eeldatava suurusega ja ekspresseerisid Taf14 valku (Joonis 12B).



Joonis 12. *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valgu ekspressiooni kontroll *western blot* meetodil. 3x5E11-Taf2-Cterm (A) ja 3xFLAG-Taf14 (B) ekspressiooni kontrolliks kasvatati transformatsioonil saadud kolooniaid üleöö galaktoosis (2%; rajad 1—8) vedelsöötmes. Proove jooksutati 15% polüakrüülamiid-geelis. *S. cerevisiae* 3x5E11-Taf2-Cterm eeldatav suurus on 21,96 kDa, 3xFLAG-Taf14 eeldatav suurus on 30,23 kDa. Suurusmarkerina oli kasutusel *PrecisionPlus Protein Dual Standards Protein Ladder* (Bio-Rad™). Mw- molekulaarmass, kDa- kilodalton.

2.3.4 *C. albicans*'i Taf14 valk ja Taf2 C-terminaalne osa interakteeruvad pagaripärmi

Et teada saada, kas saadud tüvedes ekspresseeruvad valgud interakteeruvad, viidi läbi ko-immunosadestamise eksperiment. Ko-immunosadestamise katses testiti algselt nelja *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valku ekspresseerivat pärmikolooni. Positiivse seandumiskontrollina kaasati *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valku ekspresseeriv koloonia (Joonis 12), kuna varasemates uurimustes oli pagaripärmi Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni näidatud. Kolooniaid kasvatati üleöö galaktoosi sisaldavas YPD

vedelsöötmes, sest valguekspressioon oli galaktoosiga indutseeritav. Ekspressiooni ja seondumise võrdluseks kasvatati samu kolooniaid üleöö ka glükoosi sisaldavas vedelsöötmes. Ko-immunosadestamise proovide ning *input*-proovide valgusignaalid tuvastati *western blot* meetodil.

Western blot meetodil tuvastati, et eksperimendi algproovides (*input*) ekspresseerusid nii pagaripärmi kui *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valk galaktoosiga indutseeritud proovides (Joonis 13B). Galaktoosis indutseeritud 3x5E11-Taf2-Cterm detekteerimisel 5E11 antikehaga oli *C. albicans*'i *input*-proovidel näha intensiivset valgusignaali 25 ja 37 kDa vahel ja *S. cerevisiae* galaktoosis indutseeritud 3x5E11-Taf2-Cterm 5E11 antikehaga detekteerimisel oli *input*-proovide valgusignaali 20 ja 25 kDa vahel. *Input*-proovide 3x5E11-Taf2-Cterm valgusignaali oli kõigi kolooniate puhul eeldatava suurusega (Joonis 13B, ülemine paneel). *C. albicans*'i ja *S. cerevisiae* 3xFLAG-Taf14 *input*-proovide detekteerimisel anti-FLAG antikehaga oli kõigi kolooniate puhul näha intensiivset signaali 25 ja 37 kDa vahel, testitud kolooniate valgusignaalid olid eeldatava suurusega (Joonis 13B, alumine paneel). Samuti olid *input*-proovide valgusignaalid tuvastatavad ainult galaktoosis indutseeritud proovide puhul. Ko-immunosadestamise eksperimendis sadestati 3xFLAG-Taf14 anti-FLAG agaroskerakestega. Seejärel kasutati *western blot*'il anti-FLAG antikeha, et veelkord kinnitada sadestatava valgu olemasolu ko-immunosadestamise käigus käideldud proovides (Joonis 13A, alumine paneel) ja 5E11 antikeha, et tuvastada, kas Taf14 valguga on seondunud 3x5E11-Taf2-Cterm (Joonis 13A, ülemine paneel).

Kõigi testitud kolooniate puhul oli ko-immunosadestamise järel näha tugev anti-FLAG antikeha signaal galaktoosis kasvanud proovides. Kuid Taf14 eeldataval suurusel detekteeriti signaale ka glükoosis kasvanud proovides. Eeldatavalt võis see signaal tekkida indutseeritava promootori "lekkimise" tagajärjel.

Nii *C. albicans*'i kui *S. cerevisiae* Taf14 seondus Taf2-Cterm valguga (Joonis 13A). Joonisel 13 on ülemisel paneelil tärniga märgitud ko-immunosadestatud valkude eeldatavad spetsiifilised signaalid. Rajal 4 (G ja L) visualiseeritud *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valku ekspresseeriv koloonia, kus on näha valkude omavahelist interaktsiooni, sai tüve numbri AKY 2935 ja *S. cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valku ekspresseeriv koloonia, kus on näha valkude omavahelist interaktsiooni, on edaspidi AKY 2911.

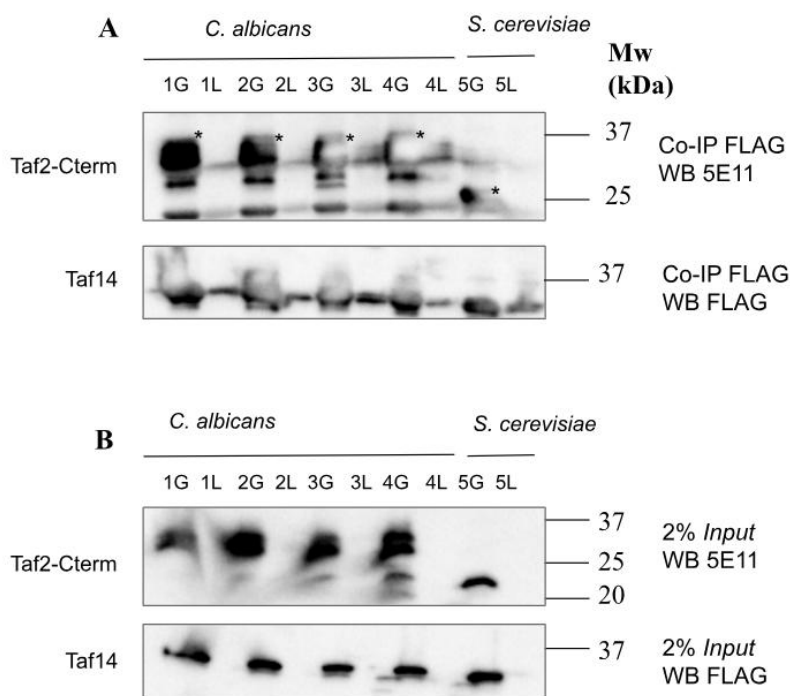
Kuna ko-immunosadestamise katse andis ka mitmeid ebaspetsiifilisi signaale (Joonis 13A, ülemine paneel), korraldati katset kasutades 5E11 antikeha, et sadestada Taf2-Cterm ja anti-FLAG antikeha, et uurida, kas ko-sadenes Taf14. Korduskatses testiti AKY 2911 ja AKY 2935 tüvede

Taf2-Cterm ja Taf14 valgu ekspressiooni ja seondumist nii glükoosi kui galaktoosiga vedelsöötmes (Lisa 2A; Lisa 2B). Kontrollina oli kasutusel AKY 2432 tüvi, milles *S. cerevisiae* endogeenne Taf14 valk ekspresseerub koos 3xFLAG märgisega ning ükski valk ei oma 3x5E11 afiinsusmärgist. Kontrolltüve puhul sooviti näha Taf14 ekspressiooni *input*-proovides ning signaali puudumist ko-immunosadestamisel. Potentsiaalne ebaspetsiifiliste valgusignaalide teke oleks andnud teavet sadestamisprotsessist tuleneva taustsignaali kohta. Korduskatsega näidati, et kasutades sadestamiseks 5E11 antikeha oli võimalik tuvastada Taf14 ja Taf2-Cterm interaktsioon *C. albicans*'i valkude ja pagaripärmi valkude puhul.

Katse tulemused toetasid varem kinnitatud hüpoteesi, et *S. cerevisiae* Taf14 valk ja Taf2 valgu C-terminaalne osa seonduvad omavahel.

Eksperimendi tulemustena leidis kinnitust uurimishüpotees, et *C. albicans*'i Taf14 valk ning Taf2 valgu C-terminaalne osa seonduvad omavahel pagaripärmi mudelsüsteemis.

G- galaktoos
L- glükoos



Joonis 13. *Candida albicans*'i ja *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valgu seondumise kontroll ko-immunosadestamisel. Joonisel on radadel 1, 2, 3 ja 4 (G ja L) *western blot* meetodil tuvastatud kolooniad, mis ekspresseerisid *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valku. Rajal 5 (G ja L) on koloonia, mis ekspresseeris *S. cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valku. Tähega G on tähistatud üleöö 2% galaktoosi vedelsöötmes indutseeritud proovid ning tähega L üleöö 2% glükoosi vedelsöötmes kasvatatud proovid. (A) anti-FLAG agaroskerakestega ko-immunosadestatud proovid. Ülemist paneeli on detekteeritud 5E11 antikehaga tuvastamaks Taf14 valgu külge seondunud Taf2-Cterm. *C. albicans*'i 3x5E11-Taf2-Cterm eeldatav suurus on 29,96 kDa ja *S. cerevisiae* 3x5E11-Taf2-Cterm eeldatav suurus on 21,96 kDa. Tärniga on tähistatud eeldatavalt spetsiifilised 3x5E11-Taf2-Cterm valgusignaalid. Alumist paneeli on detekteeritud anti-FLAG antikehaga. *C. albicans*'i 3xFLAG-Taf14 eeldatav suurus on 31,81 kDa ning *S. cerevisiae* 3xFLAG-Taf14 eeldatav suurus on 30,23 kDa. (B) *Input*-proovid, ülemise paneeli proove on detekteeritud 5E11 antikehaga ja alumise paneeli proove anti-FLAG antikehaga. Suurusmarkerina oli kasutusel *PrecisionPlus Protein Dual Standards Protein Ladder* (Bio-Rad™). Mw- molekulaarmass, kDa- kilodalton, Co-IP- ko-immunosadestamine, WB-*western blot*, FLAG- anti-FLAG.

2.4 Arutelu

Ravimresistentsete patogeenide arvu kasv maailmas on muutumas aina suuremaks probleemiks. Haigustekitajate ohjamiseks on vaja leida uusi ravimite sihtmärke (Vitiello jt, 2023). Üks surmavaid seeninfektsioone põhjustav patogeen on *Candida albicans*, kelle genoomis leidub kottseentele omane TFIID kompleksi alaühik Taf14. Taf14 valk võiks olla üks potentsiaalne ravimisihtmärk, kuna seda ei leidu inimorganismis ja Taf14 sihtmärgina kasutavad ravimid oleksid selektiivsemad, mis aitaks vähendada nende võimalikke kahjulikke kõrvalmõjusid inimestele. Varasemates uuringutes on näidatud *C. albicans*'i Taf14 valgu osalust patogeeni kohastumisvõimes ning rakuseina ja hüüfide moodustumises ning samuti TAF2 transkripti taseme tõusu patoloogilistes tingimustes (Wang jt, 2020; *Candida Genome Database* kodulehekülg, i.a). *Saccharomyces cerevisiae*'s on demonstreeritud Taf2 ja Taf14 valkude seondumist Taf2 valgu C-terminaalse osa läbi ja interaktsiooni olulisust normaalse kasvukiiruse ja stressitaluvuse säilitamises (Klein jt, 2022). Kui Taf2 on evolutsiooniliselt konserveerunud TFIID kompleksi alaühikuna pärmist inimeseni, siis Taf14 leidub peamiselt kottseentes ning valk ei ole evolutsiooniliselt konserveerunud (Cheng jt, 2024; Feigerle ja Weil, 2016; Han jt, 2023).

Et täpsemalt uurida Taf14 ja Taf2 interaktsiooni inhibitsiooni kui potentsiaalset ravimisihtmärki, tekkis idee luua inimesele võimalikult ohutu mudelsüsteem, kus pagaripärm ekspresseerib *C. albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalset osa heteroloogselt. Saadud tüves tehti ko-immunosadestamise katsetes kindlaks Taf2-Cterm ja Taf14 valgu seondumine.

Töö eksperimentaalses osas loodud mudelsüsteemi eelis on põhjalik pagaripärmi geneetiline kirjeldatus ja kerge geneetiline manipuleeritavus võrreldes *C. albicans*'iga. Taf2 ja Taf14 valkude struktuuride ja funktsioonide konserveeritus toetab *S. cerevisiae* kasutamist mudelsüsteemina. Lisaks on *S. cerevisiae* kiire kasvuga ja selle kasutamine on erinevalt *C. albicans*'i rakkudest inimesele ohutu. Loodud tüvi AKY 2935 sobib tulevikus ka Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni inhibiitorite suure läbilaskevõimega skriininguks.

Mudelsüsteemi kasutamise üks potentsiaalsetest negatiivsetest külgedest on *S. cerevisiae* ja *C. albicans*'i erinevad regulatoorsed võrgustikud ning võimalikud posttranslatsioonilised modifikatsioonid, mis võivad mõjutada Taf2 ja Taf14 valkude seondumist ja potentsiaalset inhibitsiooni *C. albicans*'is. Kuna *C. albicans*'is on nimetatud valke vähem uuritud kui pagaripärmis, võivad *C. albicans*'i rakus Taf2 ja Taf14 interaktsioonis osalevad valgud ja kofaktorid puududa loodud mudelsüsteemis. TAF14 ja TAF2-Cterm geenid ekspresseeruvad läbi viidud eksperimendis tugeva indutseeritava promootori alt, mistõttu toimus Taf2-Cterm ja

Taf14 valgu üleekspressioon ja interaktsioon võis olla tuvastatav valkude kõrge lokaalse kontsentratsiooni tagajärjena. Tulevastas katsetes saaks potentsiaalse probleemi lahendamiseks konstrueerida pärmitüve, kus *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valguekspressioon oleks valkude naturaalse promootorite kontrolli all.

Töö eksperimentaalses osas kasutati AlphaFold 3.0 struktuuriennustusplatvormi, et teha kindlaks, kui tõenäoliselt *C. albicans*'i Taf14 ja Taf2 valgu C-terminaalse osa moodustavad kompleksi *in silico*. *C. albicans*'i ja *S. cerevisiae* Taf14 ja Taf2-Cterm interaktsiooni struktuuriennustused sarnanevad üksteisega ning mõlema Taf14 valk sisaldab samu struktuurielemente. Samas on *C. albicans*'i ja *S. cerevisiae* Taf2 struktuuris AlphaFold ennustuse põhjal tuvastatavad erinevused. *C. albicans*'i Taf2-Cterm struktuuris esineb kaheksa β -lehte ja neli α -heeliksit. *S. cerevisiae* Taf2-Cterm struktuuris seevastu on kuus β -lehte ja üks α -heeliks valgu C-terminaalses osas. Struktuuriennustuste põhjal ei nähtud *C. albicans* puhul sama interaktsiooni piirkonda kui *S. cerevisiae*s. Kuigi eksperimentaalselt tuvastati interaktsioon *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valgu vahel, ei saa läbi viidud katsete põhjal määrata, kas omavahel interakteeruvad samad struktuurielemendid kui *S. cerevisiae* valkude puhul (Joonis 7). Tulevikus saaks *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsioonikohti kindlaks määrata, muteerides või deleteerides *S. cerevisiae* teada olevate interaktsioonikohtade analoogid *C. albicans*'is. Seejärel saaks uurida eksperimendi mõju valk-valk interaktsioonile ja võrrelda seda pagaripärmis täheldatud interaktsiooni inhibitsioonist põhjustatud muutustega.

Töö eksperimentaalses osas tuvastatud interaktsioon on reprodutseeritav nii anti-FLAG agarooskerakestega kui ka 5E11 antikehaga sadestades ning toetab ideed, et Taf2-Taf14 seondumine on liikideüleselt säilinud. Seega on pagaripärm sobilik platvorm edasisteks uurimusteks interaktsiooni inhibiitorite tuvastamiseks.

Eeldades, et *C. albicans*'is on Taf2-Cterm ja Taf14 interaktsioon vajalik TFIID transkriptsioonikompleksi moodustumises, nagu seda on näidatud *S. cerevisiae*'s, võivad tulevased interaktsiooni inhibiitorid põhjustada häiritud stressivastuseid, pärssida *C. albicans*'i kohanemisvõimet peremeesorganismis, aeglustada rakukasvu või isegi vähendada patogeeni elulemust. Samas pole interaktsiooni pärssimise mõju patogeenile veel uuritud, mistõttu on välja pakutud tagajärjed kõigest teoreetilised. Et hüpoteesi kontrollida, saaks tulevast katsetes keskenduda *C. albicans*'i Taf14 ja Taf2 C-terminaalse osa valk-valk interaktsiooni inhibeerimisele esmalt töös loodud mudelsüsteemis ja seejärel ka *C. albicans*'i rakkudes.

Interaktsiooni inhibiitoritena saaks kasutada näiteks peptiidseid või väikemolekulaarseid inhibiitoreid. Kandidaatinhibiitori esmast toimivust saab hinnatada *C. albicans*'is, ekspresseerides seda indutseeritava konstrukti abil. Eksperiment võimaldaks uurida, kas kandidaatinhibiitor mõjutab kottseene kasvu või stressitaluvust sarnaselt Taf14 funktsiooni häirimise mõjule *S. cerevisiae*'s. Peptiidse inhibitsiooni efektiivsust saaks hinnata vedelkultuuris määratud minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni, kolooniaid moodustavate ühikute (CFU) loendamise ning tetrazoliumsooladel põhinevate metaboolse eluvõime testide abil nii standard- kui ka stressitingimustes. Lisaks saaks kasutada hüüfide morfogeneesi analüüse, mis toimivad virulentsusega seotud fenotüüpide kaudse indikaatorina. Inhibitoorse aktiivsuse tuvastamisel võib testida rakku sisestatavaid peptiide (CPP), mis suudavad translokeeruda *C. albicans*'i rakkudesse. Samuti võib testida ka peptiidide konjugatsiooni rakku histatiin-5 põhjal loodud kandja järjestustega, mis kasutavad transpordisüsteemi, mis ei eksisteeri imetajarakkudes.

Käesolev töö näitas, et *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valku saab heteroloogset ekspresseerida pagaripärmis ning need moodustavad tuvastatava interaktsiooni. Tulemused toetavad pagaripärmi kasutatavust lihtsustatud mudelsüsteemina nimetatud valgupaari uurimiseks ja loovad aluse tulevastele uuringutele, mille eesmärk on kaardistada interaktsioonimehhanism ning arendada selle häirimisele suunatud inhibiitorite skriiningplatvorm.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli luua *Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteem, mis ekspresseeriks *Candida albicans*'i Taf14 valku ja Taf2 valgu C-terminaalset osa, et uurida kahe valgu potentsiaalset omavahelist interaktsiooni. *S.cerevisiae*'s on nende kahe valgu interaktsioon oluline pärmseene elulemusele ning selle puudumine põhjustab rakkude kasvu aeglustumist ja stressitundlikkust. Süsteemi, milles tuvastatakse *C. albicans*'i valkude seondumine, oleks võimalik kasutada tulevasteks eksperimentides valk-valk interaktsiooni inhibiitorite testimiseks.

Töö esimeses etapis konstrueeriti pärmitüve loomiseks plasmiid, mis sisaldab *C. albicans*'i TAF2 geeni C-terminaalset osa ja TAF14 geeni. Teise etapina konstrueeriti pagaripärmitüvi, milles ekspresseerusid galaktoosiga indutseerimisel *C. albicans*'i Taf14 valk ja Taf2 valgu C-terminaalne osa. Kontrollina loodi ka *S. cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valke ekspresseeriv tüvi.

C. albicans'i valkude omavahelise seondumise uurimiseks viidi läbi ko-immunosadestamise eksperiment. Eksperimendi tulemused kinnitasid, et *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valk seonduvad omavahel pagaripärmi mudelsüsteemis.

Loodud mudelsüsteemi saaks tulevikus kasutada *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valk-valk interaktsiooni uurimiseks, interaktsiooni inhibiitorite leidmiseks ning kaardistamiseks inhibitsiooni mõju rakule.

RESÜMEE/ SUMMARY

The interaction of *Candida albicans* Taf2 and Taf14 proteins in baker's yeast model system

Mona Rebeka Adson

Summary

The need for novel therapeutic targets against fungal infections has risen as a response to drug-resistant fungal pathogens and the toxicity of currently available anti-fungal drugs (Vitiello jt, 2023). One such target could be an asomycete-specific TFIID subunit Taf14, as it does not appear in humans and therefore would minimize the risk of negative off-target effects to humans. Besides TFIID, Taf14 is also present in chromatin remodeling complexes, other transcriptional complexes and a histone acetyltransferase complex. Taf14 has an ET-domain, through which it has been shown to bind to the C-terminal domain of Taf2 in *Saccharomyces cerevisiae* in order to be recruited into the TFIID complex. Lack of binding results in slow growth as well as a temperature sensitive phenotype (*Saccharomyces Genome Database* kodulehekülg, i.a; Klein jt, 2022).

Taf14 and Taf2 are also present in a fungal yeast *Candida albicans*. It is an opportunistic pathogen that is found in normal human microbiota but may turn pathogenic in the case of immunosuppression. The virulence of *C. albicans* depends on its various virulence factors as well as its ability to adapt to environmental changes (Deorukhkar ja Roushani, 2017; Wang jt, 2020). Taf14 has been shown to affect the pathogen's virulence and viability, as the absence of the TAF14 gene in *C. albicans* results in gene expression and chromatin regulation disorders (Wang jt, 2020). *C. albicans* Taf2 has also been identified as a possible subunit of TFIID (*Candida Genome Database* kodulehekülg, i.a).

The overall aim of this study was to construct a *S. cerevisiae* strain, which expresses *C. albicans* Taf14 protein and Taf2 C-terminal protein domain, as it might be harmful to work with *C. albicans* itself. Such a strain would then be used in a co-immunoprecipitation experiment, to test whether the *C. albicans* proteins bind to one another as has been shown for *S. cerevisiae* Taf14 and Taf2. This study would give way to research involving inhibitors of the protein interaction.

In the first stage of the project, a plasmid containing *C. albicans* TAF2 C-terminal gene with a 3x5E11 epitope tag and TAF14 gene with a 3xFLAG epitope tag was constructed. The protein-

coding genes were placed under a galactose-inducible promoter. The plasmid was transformed into a *S. cerevisiae* strain. Expression of the protein-coding genes of interest was assessed using western blot analysis. Strains expressing both *S. cerevisiae* and *C. albicans* Taf14 protein and Taf2 C-terminal protein domain were identified and the binding of the proteins was tested in a co-immunoprecipitation assay. It was established that *C. albicans* proteins of interest bind to one another in *S. cerevisiae* model system.

The next steps could involve testing various peptidic and small-molecule inhibitors on the model system in order to inhibit the protein-protein interaction. If an effective inhibitor is found, its antifungal activity can be tested in *C. albicans* in order to study the changes in *C. albicans*' virulence, growth rate and gene expression in the absence of Taf14-Taf2 C-terminal protein domain complex. Since a lowered temperature resistance and slow growth has been identified in *S. cerevisiae* as a result of the inhibition of the binded complex, it would be valuable to test the same theory in a pathogenic organism such as *C. albicans* (Klein jt, 2022).

The results provide a basis for further research into *C. albicans*' virulence and transcription mechanisms.

TÄNUSÕNAD

Ma soovin tänada oma imelist juhendajat Signe Värvi, kes õpetas mulle palju laboritöö tehnikate ja tavade kohta ning kes jaksas vastata mu lõpmatutele küsimustele iga väiksemagi teema kohta nii laboris kui ka tööd kirjutades. Ma olen väga tänulik, et sain niivõrd abivalmis ja südamliku juhendaja. Samuti soovin tänada ka teisi Kromatiini töörühma liikmeid ja kaastudengeid, kes olid alati sõbralikult valmis nõu andma ning vajadusel uusi metoodikaid tutvustama.

Viimaks soovin tänada ka oma partnerit ta vankumatu toe ja innustuse eest läbi iga katse ja iga uurimistöö peatüki kirjutamise.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Allert, S., Förster, T. M., Svensson, C.-M., Richardson, J. P., Pawlik, T., Hebecker, B., Rudolphi, S., Juraschitz, M., Schaller, M., Blagojevic, M., Morschhäuser, J., Figge, M. T., Jacobsen, I. D., Naglik, J. R., Kasper, L., Mogavero, S. ja Hube, B. (2018). *Candida albicans*-Induced Epithelial Damage Mediates Translocation through Intestinal Barriers. *mBio*, 9(3), 10.1128/mbio.00915-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00915-18>
- Andrews, F. H., Shinsky, S. A., Shanle, E. K., Bridgers, J. B., Gest, A., Tsun, I. K., Krajewski, K., Shi, X., Strahl, B. D. ja Kutateladze, T. G. (2016). The Taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nature Chemical Biology*, 12(6), 396–398. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2065>
- Bensasson, D., Dicks, J., Ludwig, J. M., Bond, C. J., Elliston, A., Roberts, I. N. ja James, S. A. (2019). Diverse Lineages of *Candida albicans* Live on Old Oaks. *Genetics*, 211(1), 277–288. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301482>
- Bhuiyan, T. ja Timmers, H. (2019). Promoter Recognition: Putting TFIID on the Spot. *Trends in Cell Biology*, 2019; 29, 752-763. 10.1016/j.tcb.2019.06.004
- Buckholz, R. G. ja Gleeson, M. A. G. (1991). Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins. *Bio/Technology*, 9(11), 1067–1072. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1067>
- Calderone, R. ja Fonzi, W. (2001). Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 327-335. *Trends in microbiology*, 9, 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
- Chen, G., Wang, D., Wu, B., Yan, F., Xue, H., Wang, Q., Quan, S. ja Chen, Y. (2020). Taf14 recognizes a common motif in transcriptional machineries and facilitates their clustering by phase separation. *Nature Communications*, 11(1), 4206. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18021-7>
- Cheng, I.-H., Pi, W.-C., Hsu, C.-H., Guo, Y., Lai, J.-L., Wang, G. G., Chung, B., Roeder, R. G. ja Chen, W.-Y. (2024). TAF2, within the TFIID complex, regulates the expression of a subset

of protein-coding genes. *Cell Death Discovery*, 10(1), 244. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02017-z>

Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(7), e428–e438. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)

Deorukhkar, S. C. ja Roushani, S. (2017). Virulence Traits Contributing to Pathogenicity of Candida Species. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 5(1). <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00140>

Doi, A. M., Pignatari, A. C. C., Edmond, M. B., Marra, A. R., Camargo, L. F. A., Siqueira, R. A., da Mota, V. P. ja Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLOS ONE*, 11(1), e0146909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>

Feigerle, J. T. ja Weil, P. A. (2016). The C Terminus of the RNA Polymerase II Transcription Factor IID (TFIID) Subunit Taf2 Mediates Stable Association of Subunit Taf14 into the Yeast TFIID Complex*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22721–22740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751107>

Han, H., Lv, F., Liu, Z., Chen, T., Xue, T., Liang, W. ja Liu, M. (2023). BcTaf14 regulates growth and development, virulence, and stress responses in the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. *Molecular Plant Pathology*, 24(8), 849–865. <https://doi.org/10.1111/mpp.13331>

Hu, H. ja Muntean, A. G. (2023). The YEATS domain epigenetic reader proteins ENL and AF9 and their therapeutic value in leukemia. *Experimental Hematology*, 124, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2023.06.001>

Ingerpuu, S., Kristjuhan, A., Mikelsaar, A. V., Tenson, T., Sikut, R., Remme, J., Kuuse, S., Maimets, T., Gerhold, J. M., Padu, E., Paves, H., Säälilik, P., Lavõgina, D., Mazina, O., Rinken, A., Kõivomägi, M., Loog, M. ja Tõnissoo, T. (2023). Rakuorganellid. S. Kuuse ja T. Maimets (toim), *Rakubioloogia* (116-118). Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

Johnston, M. (1996). Genome sequencing: The complete code for a eukaryotic cell. *Current Biology*, 6(5), 500–503. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00526-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00526-2)

Klein, B. J., Feigerle, J. T., Zhang, J., Ebmeier, C. C., Fan, L., Singh, R. K., Wang, W. W., Schmitt, L. R., Lee, T., Hansen, K. C., Liu, W. R., Wang, Y.-X., Strahl, B. D., Anthony Weil,

- P. ja Kutateladze, T. G. (2022). Taf2 mediates DNA binding of Taf14. *Nature Communications*, 13(1), 3177. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30937-w>
- Kolesnikova, O., Ben-Shem, A., Luo, J., Ranish, J., Schultz, P. ja Papai, G. (2018). Molecular structure of promoter-bound yeast TFIID. *Nature Communications*, 9(1), 4666. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07096-y>
- Mallick, E. M., Bergeron, A. C., Jones, S. K., Newman, Z. R., Brothers, K. M., Creton, R., Wheeler, R. T. ja Bennett, R. J. (2016). Phenotypic Plasticity Regulates *Candida albicans* Interactions and Virulence in the Vertebrate Host. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00780>
- Martinez, E. (2002). Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Molecular Biology*, 50(6), 925–947. <https://doi.org/10.1023/A:1021258713850>
- Maza, P. K., Bonfim-Melo, A., Padovan, A. C. B., Mortara, R. A., Orikaza, C. M., Ramos, L. M. D., Moura, T. R., Soriani, F. M., Almeida, R. S., Suzuki, E. ja Bahia, D. (2017). *Candida albicans*: The Ability to Invade Epithelial Cells and Survive under Oxidative Stress Is Unlinked to Hyphal Length. *Frontiers in microbiology*, 8, 1235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01235>
- Mattanovich, D., Sauer, M. ja Gasser, B. (2014). Yeast biotechnology: Teaching the old dog new tricks. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-34>
- Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., ... Naglik, J. R. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532(7597), 64–68. <https://doi.org/10.1038/nature17625>
- Nandy, S. K. ja Srivastava, R. K. (2018). A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research*, 207, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013>
- Nemet, J., Vidan, N. ja Sopta, M. (2017). A meta-analysis reveals complex regulatory properties at Taf14-repressed genes. *BMC Genomics*, 18(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3544-6>

- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L. ja Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Peil, K., Jürgens, H., Luige, J., Kristjuhan, K. ja Kristjuhan, A. (2020). Taf14 is required for the stabilization of transcription pre-initiation complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Epigenetics & Chromatin*, 13, 24. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00347-7>
- Rosiana, S., Zhang, L., Kim, G. H., Revtovich, A. V., Uthayakumar, D., Sukumaran, A., Geddes-McAlister, J., Kirienko, N. V. ja Shapiro, R. S. (2021). Comprehensive genetic analysis of adhesin proteins and their role in virulence of *Candida albicans*. *Genetics*, 217(2), iyab003. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab003>
- Shen, W., Bhaumik, S. R., Causton, H. C., Simon, I., Zhu, X., Jennings, E. G., Wang, T., Young, R. A. ja Green, M. R. (2003). Systematic analysis of essential yeast TAFs in genome-wide transcription and preinitiation complex assembly. *The EMBO Journal*, 22(13), 3395–3402. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg336>
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I. ja Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(2), 79. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- Teder, K. (2023). *Transkriptsiooni regulaator Taf14 funktsioonide uurimine pagaripärmis Saccharomyces cerevisiae*. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool, geenitehnoloogia õppekava.
- Tsui, C., Kong, E. F. ja Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S. ja Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11665. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>
- Vitiello, A., Ferrara, F., Boccellino, M., Ponzo, A., Cimmino, C., Comberiati, E., Zovi, A., Clemente, S. ja Sabbatucci, M. (2023). Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. *Biomedicines*, 11(4), 1063. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041063>

Wang, Q., Verma, J., Vidan, N., Wang, Y., Tucey, T. M., Lo, T. L., Harrison, P. F., See, M., Swaminathan, A., Kuchler, K., Tscherner, M., Song, J., Powell, D. R., Sopta, M., Beilharz, T. H. ja Traven, A. (2020). The YEATS Domain Histone Crotonylation Readers Control Virulence-Related Biology of a Major Human Pathogen. *Cell Reports*, 31(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107528>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

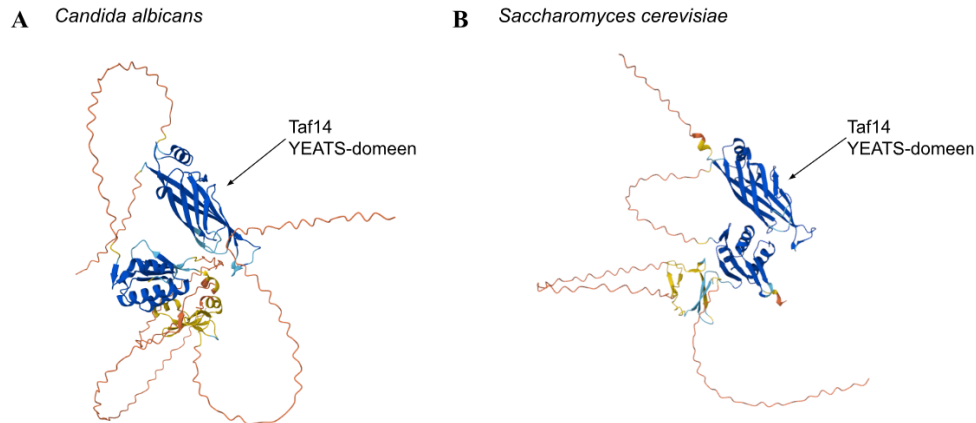
Candida Genome Database kodulehekül. (i.a). Kasutatud 25.04.2026.
<https://www.candidagenome.org/>

Saccharomyces Genome Database kodulehekül. (i.a). Kasutatud 25.04.2026.
<https://yeastgenome.org/>

String kodulehekül. (i.a). Kasutatud 01.05.2026. <https://string-db.org/network/4932.YCR042C>

LISAD

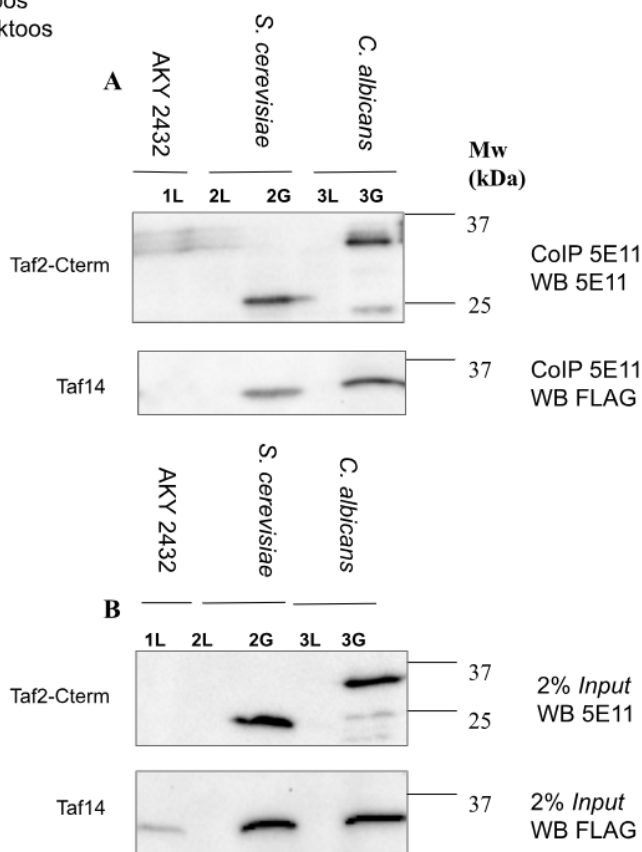
Lisa 1.



***Candida albicans*'i ja *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni ennustus.** *C. albicans*'i (A) ja *S.cerevisiae* (B) Taf2-Cterm ja Taf14 valgu interaktsiooni ennustus. Oranž värv tähistab väga madalat usaldusväärsust struktuuris (pLDDT < 50), kollane madalat usaldusväärsust (70 > pLDDT > 50), helesinine kõrget usaldusväärsust (90 > pLDDT > 70) ja tumesinine väga kõrget usaldusväärsust (pLDDT > 90) 3D struktuuris. Struktuuriennustused on koostatud AlphaFold 3.0 serveris (Abramson jt, 2024).

Lisa 2.

L- glükoos
G- galaktoos



***Candida albicans*'i ja *Saccharomyces cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valgu ko-immuunosadestamine ja immuunodetektsioon.** Rajal 1L glükoosis kasvatatud AKY 2432 kontrolltüvi, rajal 2 (L ja G) AKY 2911 koloonia, mis ekspresseeris *S. cerevisiae* Taf2-Cterm ja Taf14 valku ning rajal 3 (L ja G) AKY 2935 tüve koloonia, mis ekspresseeris *C. albicans*'i Taf2-Cterm ja Taf14 valku. Tähistatud on üleöö 2% galaktoosiga (G) ja 2% glükoosiga (L) vedelsöötmes kasvanud proovid. (A) Ko-immuunosadestamine, sadestatud 5E11 antikeha ja proteiin-A-ga seotud sefarooskerakestega. *C. albicans*'i 3x5E11-Taf2-Cterm eeldatav suurus on 29,96 kDa ja *S. cerevisiae* 3x5E11-Taf2-Cterm eeldatav suurus on 21,96 kDa. Alumist paneeli on detekteeritud anti-FLAG antikehaga tuvastamaks Taf2-Cterm külge seondunud Taf14 valku. *C. albicans*'i 3xFLAG-Taf14 eeldatav suurus on 31,81 kDa ja *S. cerevisiae* 3xFLAG-Taf14 eeldatav suurus on 30,23 kDa. (B) *Input*-proovid, ülemise paneeli proove on detekteeritud 5E11 antikehaga ja alumise paneeli proove anti-FLAG antikehaga. Suurusmarkerina on kasutusel *PrecisionPlus Protein Dual Standards Protein Ladder* (Bio-Rad™). Mw- molekulaarmass, kDa- kilodalton, Co-IP- ko-immuunosadestamine, WB- *western blot*, FLAG- anti-FLAG.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mona Rebeka Adson,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose ''*Candida albicans*''i Taf2 ja Taf14 valgu interaktsioon pagaripärmi mudelsüsteemis'', mille juhendaja on Signe Värvi, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mona Rebeka Adson

25.05.2026