

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Nikolina Vidan Rogulj

**Uloga proteina Taf14 iz obitelji YEATS  
u odgovoru na stanični stres**

doktorska disertacija

Osijek, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković

Doktorska disertacija

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

### Uloga proteina Taf14 iz obitelji YEATS u odgovoru na stanični stres

Nikolina Vidan Rogulj

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković i Laboratoriju za gljivična oboljenja i medicinsku mikologiju, Instituta za biomedicinska istraživanja Monash, Melbourne, Australija.

Mentori: dr. sc. Marija-Mary Sopta i dr. sc. Ana Traven

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

Protein Taf14 sudjeluje u transkripciji, prepoznavanju i preinaci kromatina, te je podjedinica komponenti predinicijskog kompleksa, a u ovom radu je ispitana njegova uloga u odgovoru stanice na stres stanične stijenke i proces filamentacije. U odsustvu proteina Taf14, kvasac *S. cerevisiae* osjetljiv je na stres stanične stijenke, te iako pokreće puteve održavanja integriteta stanične stijenke i očekivanih procesa, transkripcijski odgovor stanice je slabiji nego kod divljeg tipa. U kontekstu filamentacije, mutanti *taf14Δ* kod kvasca *S. cerevisiae* pokazali su smanjenu sposobnost širenja po podlozi, kao i prodiranja u podlogu, a izazvani manjkom nutrijenata ne pokazuju karakteristično grananje kolonija. Nadalje, u uvjetima koji potiču filamentaciju, kod mutanta *taf14Δ* ne dolazi do aktivacije prepisivanja upute za gen *FLO11* koji kodira ključni protein za različite oblike filamentacije.

Posljedice odsustva Taf14 u stanici koje su uočene ovim istraživanjem mogu biti posljedica poremećaja stabilnosti kompleksa čiji je on dio, a uključeni su u transkripciju, remodeliranje kromatina i preinake histona. Pretpostavlja se da mehanizam stabilizacije i prepoznavanja posttranslacijskih modifikacija koji vjerojatno vrši Taf14, predstavlja dodatni mehanizam u odgovoru kvasca na izazove iz okoliša.

Broj stranica: 113

Broj slika: 33

Broj tablica: 17

Broj literaturnih navoda: 92

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: obitelj proteina YEATS, protein Taf14, stanični stres, stanična stijenka, filamentacija

Datum obrane: 23. svibnja 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Đurđica Ugarković

2. prof. dr. sc. Ivica Rubelj

3. prof. dr. sc. Vera Cesar

4. dr. sc. Krunoslav Brčić Kostić (zamjena člana)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**University of Dubrovnik**

**Ruder Bošković Institute**

**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area: Natural sciences**

**Scientific Field: Biology**

### **Role of Taf14 YEATS protein in cell stress response**

**Nikolina Vidan Rogulj**

Thesis performed at Laboratory for molecular and cell biology, Department for Molecular Biology, Ruder Bošković Institute, Zagreb, Croatia and Laboratory for fungal infections and medical mycology, Monash Biomedicine Discovery Institute, Melbourne, Australia  
Supervisors: Mary Sopta, PhD and Ana Traven, PhD

Short abstract:

The yeast protein Taf14 is known to be involved in transcription, chromatin remodeling and histone modification. In this study, we addressed the role of Taf14 in the cell wall stress response and filamentation. We show that in the absence of Taf14, yeast cells are sensitive to cell wall stress induced by Calcofluor White or Congo Red. Gene expression analysis during induced cell wall stress showed that although cell wall integrity pathways are activated, the overall transcriptional response is smaller compared to wild type cells. In terms of filamentation, *S. cerevisiae taf14Δ* mutants show less formation of biofilm-like structures (mats), lower surface adhesion levels and no agar invasion. Faced with limited nitrogen sources, *taf14Δ* mutant colonies seem to form round rather than characteristic elongated forms observed with the wild type. Also, when grown with low glucose levels, *taf14Δ* mutants fail to upregulate the expression of the key filamentation regulator Flo11. These results can be assigned to a possible destabilization of transcription, chromatin remodeling or histone modification complexes. It is proposed that Taf14, as a subunit of various transcription-related complexes, plays a role in the recruitment and stabilization of these complexes as part of a back-up mechanism in cellular stress response.

Number of pages: 113

Number of figures: 33

Number of tables: 17

Number of references: 92

Original in: Croatian

Key words: YEATS protein family, Taf14 protein, cell stress, cell wall, filamentation

Date of the thesis defense: May 23, 2022

Reviewers:

1. prof. Đurđica Ugarković, PhD

2. prof. Ivica Rubelj, PhD

3. prof. Vera Cesar, PhD

4. Krunoslav Brčić Kostić, PhD (substitute member)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju pri Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Marije-Mary Sopta i Laboratoriju za gljivična oboljenja i medicinsku mikologiju Instituta za biomedicinska istraživanja pri Sveučilištu Monash (Melbourne, Australija) pod vodstvom dr. sc. Ane Traven.

Disertacija je dio projekta "Functional characterization of the fungal specific protein Taf14 in *S. cerevisiae* and *C. albicans*" financiranog od Hrvatske zaklade za znanost iz programa UKF - Jedinstvo uz pomoć znanja.

*Hvala...*

*... mentorici dr. sc. Mary Sopta na prilici da napravim prve znanstvene korake i kasnije sudjelujem u radu njene istraživačke grupe. Hvala mentorici dr. sc. Ani Traven, posebno za period koji sam provela u Australiji gdje je učinila da s njom imam osjećaj doma i sigurnosti dok stječem neprocjenjivo iskustvo. Hvala vam objema na savjetima, ohrabrenju i toplini koja je odavno prerasla odnos studenta i mentora.*

*Hvala kolegama s Monasha i Instituta Ruđer Bošković koji su uvijek bili spremni pomoći savjetima, ustupiti materijale i uređaje. Hvala i za usputne šale i duge rasprave uz kavu koje su znale vratiti elan "oblačnom" danu.*

*Hvala članovima Laboratorija za molekularnu i staničnu biologiju, bivšim i sadašnjim, bez kojih ova avantura ne bi bila to što jest, a ja bih bila siromašnija za čak nekoliko prijatelja.*

*Hvala mom Toniju na ljubavi, smijehu, podršci i na meni još nevjerojatnom razumijevanju koje sve učini lakšim i ljepšim. Sviđaš mi se 😊*

*Mojoj mami, mom osloncu uvijek i u svemu. Nisam pronašla riječ kojom bih opisala zahvalnost za Njenu ljubav i način kojim prožima svaki trenutak mog života - čarobnim zagrljajem, kroz smijeh i poneku suzu koju vješto pretvori u smijeh. Možda je najbolje vratiti se onim dječjim riječima: "volim te do kraja svijeta..." <3*

*Vrijeme je privilegija uz koju imamo priliku učiti od puno ljudi. Negdje ostaju tragovi njihovih priča, nekad samo pogleda, pokreta i susreta koji se probude kad mislimo da smo i zaboravili. Povremeno previdimo da od njih učimo život. Moja hrpica posebnih ljudi naizgled nije povezana s ovim radom, ali Oni su utjecali na mene i njihove riječi su bile sa mnom i na ovom putu. Neke od tih riječi su vrijedne uspomene, dio će imati i nastavke, a zajedno su najljepše što imam.*

*Ovaj rad posvećen je ljubavi mog tate Tonća koju uvijek osjećam i osmijesima mog Bebelog koji su uvijek uz mene.*

*Nina*

# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Regulacija transkripcije i kromatin .....	2
1.2.	Protein Taf14 i domena YEATS .....	7
1.3.	Stanični stres .....	11
1.4.	Stanična stijenka.....	14
1.4.1.	Signalni put CWI.....	15
1.4.2.	Stanična stijenka gljivice <i>C. albicans</i> .....	17
1.5.	Filamentacija .....	19
1.6.	Cilj istraživanja .....	22
2.	MATERIJALI I METODE .....	23
2.1.	Materijali .....	24
2.1.1.	Kemikalije i reagensi.....	24
2.1.2.	Hranjive podloge i dodaci podlogama .....	25
2.1.3.	Organizmi i plazmidi.....	27
2.1.4.	Početnice .....	30
2.2.	Metode.....	32
2.2.1.	Konstrukcija sojeva kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
2.2.2.	Ispitivanje rasta i otpornosti na toksične spojeve.....	35
2.2.3.	Filamentacija .....	38
2.2.4.	Analiza ekspresije gena.....	40
3.	REZULTATI.....	42
3.1.	Fenotipska karakterizacija mutanta <i>TAF14</i> .....	43
3.1.1.	Fenotipska karakterizacija sojeva <i>C. albicans</i> .....	43

3.1.2. Fenotipska karakterizacija sojeva <i>S. cerevisiae</i> .....	46
3.2. Utjecaj mutacije <i>TAF14</i> na očuvanje integriteta stanične stijenke.....	50
3.2.1. Rast i stanični ciklus pri izlaganju CFW .....	50
3.2.2. Analiza ekspresije gena u uvjetima stresa stanične stijenke .....	52
3.3. Utjecaj mutacije <i>TAF14</i> na filamentaciju.....	65
3.3.1. Fenotipske analize rasta pseudohifa i stvaranja biofilma.....	65
3.3.2. Analiza ekspresije gena uključenih u filamentaciju .....	71
4. RASPRAVA.....	73
5. ZAKLJUČCI.....	82
6. LITERATURA.....	84
7. SAŽETAK.....	94
8. SUMMARY .....	97
9. PRILOZI.....	100
10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA .....	104

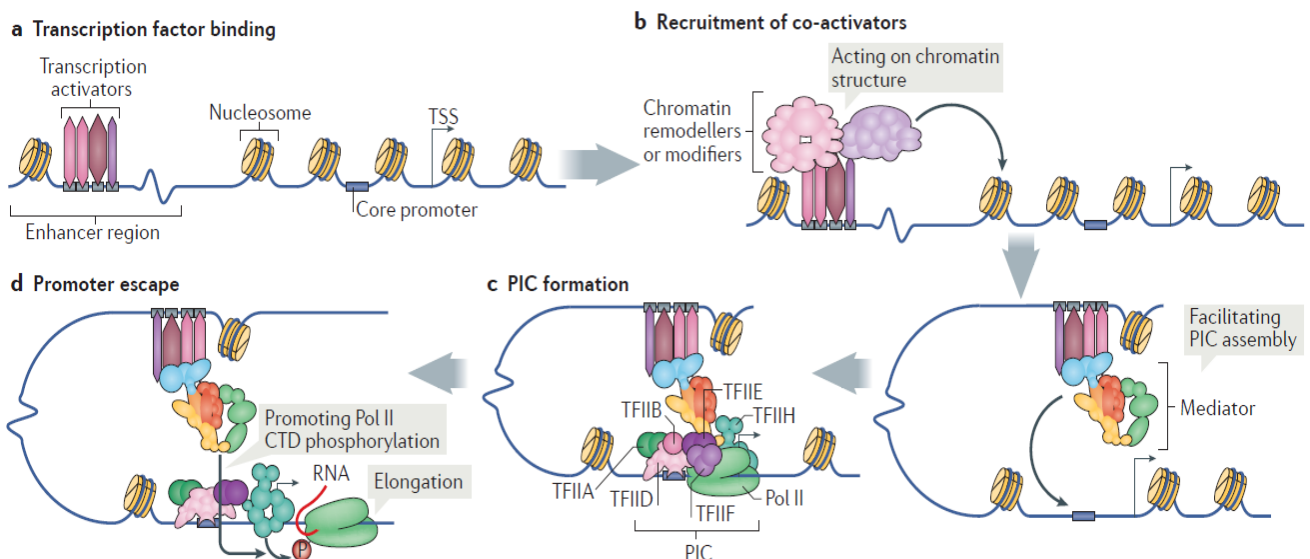
## **1. UVOD**



## 1.1. Regulacija transkripcije i kromatin

Temeljni mehanizmi regulacije gena očuvani su kod svih eukariota. Modelni organizam za istraživanja, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, desetljećima služi kao neizostavan alat u razotkrivanju osnovnih staničnih mehanizama i procesa pa su tako razjašnjeni i detalji regulacije transkripcije i uloge kromatina u transkripciji.

Poznato je da stanice sadrže upute za stvaranje velikog broja proteina, ali i da su specijalizirane i pragmatične pa stoga prema uputama iz okoliša stvaraju samo one proteine koji su im potrebni za njihove zadaće. Sinteza glasničke RNA (mRNA) je ključan proces za definiranje stanice i njene uloge. Transkripcija počinje stvaranjem predinicijacijskog kompleksa (PIC, engl. *preinitiation complex*) kojeg čine enzim RNA polimeraza II i opći transkripcijski faktori, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE i TFIIH (slika 1.) (Nogales *et al.*, 2017). Ovaj kompleks stvara se na promotorskoj regiji dvolančane DNA, a slijedi ga razdvajanje DNA pomoću energije iz ATP-a, prepoznavanje početnog mjesta transkripcije (TSS, engl. *transcription start site*) te inicijacija sinteze RNA. U cijelom procesu sudjeluju i aktivatori i represori transkripcije koje s RNA polimerazom II i općim transkripcijskim faktorima povezuju koaktivatori i korepresori (Lee i Young, 2000, Hahn i Young, 2011).



Slika 1. Shematski prikaz transkripcije kod eukariota. Nakon vezanja transkripcijskih faktora i koaktivatora te preinaka kromatina, formira se predinicijacijski kompleks kojeg slijedi inicijacija i elongacija. Prikaz je informativan i veličine ne odgovaraju stvarnim omjerima veličina sastavnica. Preuzeto iz Soutourina, 2018.

Stvaranje predinicijacijskog kompleksa je često regulirano transkripcijskim faktorima koji su specifični za neki gen (Donczew i Hahn, 2017). Stoga se i regulacija transkripcije velikim dijelom temelji na regulaciji transkripcijskih faktora.

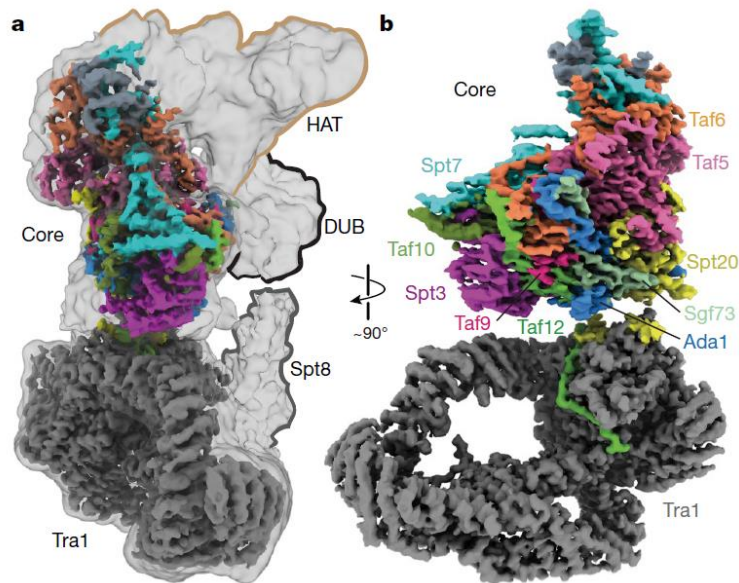
Uz proteine koji sudjeluju u regulaciji transkripcije, ulogu imaju i različiti promotorski elementi odnosno specifični slijedovi DNA. Srž promotora je regija koju zahvaća predinicijacijski kompleks i obično se radi o barem 60 pb (parova baza) koji predstavljaju najmanji element koji je potreban za aktivaciju transkripcije (Smale i Kadonaga, 2003). Neki od do danas poznatih elemenata koji se nalaze u srži promotora su inicijatorski element - Inr, DPE (engl. *downstream promotor element*), MTE (engl. *motive ten element*), DCE (engl. *downstream core element*) te BREu i BREd (engl. *TFIIB recognition element; upstream/downstream*). Svakako je najpoznatiji element TATA kojeg nalazimo uzvodno od mjesta početka transkripcije i koji je prema dostupnim podacima, prisutan u tek oko 20 % promotora u stanicama sisavaca. Element TATA je mjesto koje prepoznaje opći transkripcijski faktor TBP (engl. *TATA-binding protein*), dok se na elemente Inr, DPE i MTE vežu podjedinice TFIID odnosno proteini Taf (engl. *TBP-associated factor*), a element BRE služi vezanju TFIIB. Uloga ovih kratkih i nespecifičnih elemenata je ispravno pozicioniranje preinicijacijskog kompleksa i vezanje regulatora transkripcije, a njihove kombinacije mogu varirati među promotorima i tako određivati aktivnost (Hahn i Young, 2011).

Transkripcijski aktivatori vežu se na uzvodne aktivatorske slijedove (UAS, engl. *upstream activation sequence*), a transkripcijski represori na uzvodne represorske slijedove (URS, engl. *upstream repression sequence*) gena koji kodiraju proteine (Hahn i Young, 2011). Proteini koji su klasificirani kao transkripcijski faktori čine jednu od najzastupljenijih skupina u kvašćevom genomu. Prema vrsti njihove DNA-vezujuće domene (DBD, engl. *DNA-binding domain*), transkripcijske faktore dijelimo u 3 skupine: one stabilizirane ionom cinka, zatim skupinu koja sadrži konformaciju *helix-turn-helix* i dimerizirajuće (engl. *zipper*; Hahn i Young, 2011). Pionirska istraživanja regulacije transkripcije kod eukariota napravljena su proučavanjem odgovora kvasca *S. cerevisiae* na rast uz galaktozu kao izvor ugljika i tako je opisan danas dobro poznati aktivator transkripcije Gal4 i pokazano je da su transkripcijski aktivatori evolucijski očuvani među eukariotima. Istraživanje grupe Ptashne razjasnilo je i da je ključna uloga transkripcijskih aktivatora okupljanje transkripcijske mašinerije na promotor ciljnog gena (Ptashne i Gann, 2002; Traven *et al.*, 2006).

Kako je ranije spomenuto, formiranje predinicijacijskog kompleksa je ključan korak za pokretanje transkripcije. Posrednici koji povezuju aktivatore i represore sa sastavnicama PIC-a su korepresori i koaktivatori. Aktiviranje transkripcije je jedan od važnijih mehanizama kontrole ekspresije gena i cilj brojnih signalnih puteva poput kontrole staničnog rasta i odgovora na okolišni ili metabolički stres. Aktivatori transkripcije često ciljaju upravo koaktivatore poput kompleksa Medijator, SAGA (engl. *Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase complex*), TFIID, NuA4 (engl. *Nucleosome Acetyltransferase of Histone H4*), Swi/Snf. Koaktivatori izravno pospješuju transkripciju djelovanjem na bazalnu transkripcijsku mašineriju i/ili preoblikovanjem kromatina te tako potiču stvaranje PIC-a (Hahn i Young, 2011).

Kompleks Medijator je evolucijski očuvan pa tako kod svih eukariota nalazimo 17 podjedinica koje su zajedničke te tvore srž kompleksa oko koje se nadograđuju druge podjedinice specifične za organizam (Bourbon, 2008). Medijator olakšava regrutaciju RNA polimeraze II, ali i stabilizira PIC te olakšava bazalnu transkripciju, a može pozitivno i negativno djelovati na aktivaciju transkripcije. Neki autori ubrajaju Medijator u osnovne komponente PIC-a (Schier i Taatjes, 2020), a vjerojatno je i da je direktna meta nekih signalnih puteva za regulaciju transkripcije (Hahn i Young, 2011).

Koaktivatorski kompleks SAGA sudjeluje u vezanju aktivatora, acetilaciji histona H3, deubikvitinaciji histona H2B i vezanju proteina TBP (Han *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019;). Sastoji se od 19 podjedinica podjeljenih u 4 modula (HAT, DUB, TAF i SPT) gdje dvije katalitičke podjedinice sudjeluju u acetilaciji i deubikvitinaciji koje su važne za inicijaciju i elongaciju u procesu transkripcije (slika 2.). Podjedinicu Tra1 koja je dio modula SPT u kompleksu SAGA nalazimo i u kompleksu NuA4, ali njihova točna uloga u sklapanju kompleksa nije do danas razjašnjena (Liu *et al.*, 2019). Novije istraživanje je pokazalo i da SAGA svojom podjedinicom Spt3 i uz pomoć TFIIA djeluje u regrutaciji odnosno nanošenju faktora TBP na DNA (Papai *et al.*, 2019).



Slika 2. Prikaz strukture kompleksa SAGA dobiven metodom krio-elektronske mikroskopije. Na prikazu a. označeni su moduli HAT, DUB, TAF ("Core") i Tra1 iz modula SPT; a u prikazu b. je izdvojen modul srži (engl. *core*) prema SPT modulu. Preuzeto iz Wang *et al.*, 2020.

Dinamični eukariotski kompleks TFIID (~1 MDa) sastoji se od proteina TBP (koji je dovoljan za pokretanje bazalne transkripcije *in vitro* na promotorima koji sadrže slijed TATA) i 13-14 podjedinica Taf te sudjeluje u vezanju aktivatora, prepoznavanju promotorskih regija i formiranju predinicijacijskog kompleksa (Nogales *et al.*, 2017). Prema rezultatima istraživanja strukture provedenih metodom krio-elektronske mikroskopije (cryo-EM) na humanom TFIID i sklopu TFIIA-TFIID-DNA predloženo je da TFIID uz TFIIA ima ulogu u nanošenju faktora TBP na DNA nakon čega proteini Taf disociraju ili prolaze kroz bitne konformacijske promjene kako bi se sklopio PIC i nastavio proces transkripcije (Patel *et al.*, 2018).

Kompleksi SAGA i TFIID dijele nekoliko istih podjedinica iako ne pripadaju istim obiteljima (Donczew *et al.*, 2020). Kompleks SAGA kod čovjeka sadrži homologe svih proteina Taf koji se nalaze u dimernoj srži kompleksa TFIID iako nije poznato jesu li u kompleksu SAGA prisutni kao dimeri (Patel *et al.*, 2018). Brojna istraživanja su pokušala detaljno razjasniti uloge kompleksa SAGA i TFIID. Pionirske cjelogenomske studije upućivale su da se transkripcija RNA polimerazom II većine gena dominantno oslanja ili na kompleks SAGA ili na kompleks TFIID (Huisinga i Pugh, 2004). Tako se smatralo da transkripcijsku kontrolu gena povezanih s rastom i *housekeeping* gena vrši TFIID, odnosno da je oko 90 % gena koje prepisuje RNA

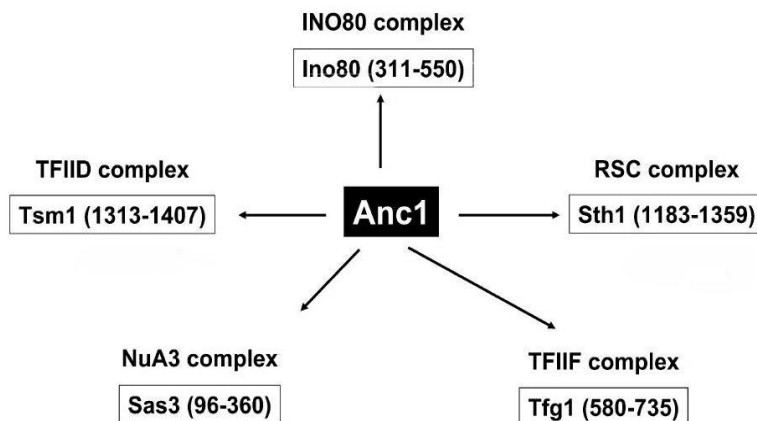
polimeraza II (od kojih mnogi ne sadrže slijed TATA) dominantno kontrolirano preko TFIID, dok geni inducirani stresom većinom sadrže slijed TATA i regulirani su kompleksom SAGA (Rhee i Pugh, 2012). Istraživanje u kojem je proučavano modificiranje kromatina ovisno o kompleksu SAGA, pokazalo je da SAGA djeluje na kromatin većine eksprimiranih gena, a ne samo ili pretežno na one kojima dominantno regulira transkripciju (Bonnet *et al.*, 2014). Novije istraživanje definira skupinu gena na čiju transkripciju djeluju i TFIID i SAGA, odnosno kod kojih oba kompleksa mogu imati ulogu regrutacije faktora TBP. Prema ovom istraživanju, tu skupinu čini 13 % od ispitivanih 83 % kodirajućih gena u kvašćevu genomu (Donczew *et al.*, 2020). Također, pokazali su i važnost uloge kompleksa SAGA kao preinačivača kromatina. Naime, mutacije koje su onemogućavale ovu funkciju kompleksa SAGA dovele su do defekta transkripcije kod većine gena.

Najučinkovitiji aktivatorski slijedovi gena nalaze se u regijama promotora koje su siromašne nukleosomima (NFR, engl. *nucleosome-free region*) i neposredno uzvodno od mjesta početka transkripcije ili su izloženi na površini nukleosoma i time lako dostupni (Li *et al.*, 2007). Općenito, regije koje se aktivno prepisuju trebaju biti dostupnije transkripcijskoj mašineriji, stoga je jasna i važnost uloge koju u aktivaciji transkripcije imaju preinačivači histona i kromatina poput koaktivatorskih kompleksa NuA4 i Swi/Snf. Kvašćev kompleks Swi/Snf je prvi otkriveni kompleks za preinaku kromatina (Stern *et al.*, 1984; Cote *et al.*, 1994) i očuvan je kod eukariota. Spada u ATP-ovisne komplekse za preinaku kromatina te djeluje na strukturu kromatina destabiliziranjem nukleosoma i srodan je kompleksu RSC (Rando i Winston, 2012). Kompleks NuA4 je acetiltransferaza histona H4 koja acetilira histon H4 i neke nehistske mete te sudjeluje u brojnim staničnim procesima od aktivacije transkripcije do popravka DNA te je evolucijski očuvana od kvasca do čovjeka (Doyon *et al.*, 2004; Setiাপutra *et al.*, 2018). Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, NuA4 je kompleks veličine ~1 MDa i sadži više podjedinica koje su podjeljene u 4 modula: modul s katalitičkom podjedinicom i ostalim faktorima za acetilaciju nukleosoma, modul za vezanje RNA polimeraze II i elongaciju, modul sličan kompleksu za remodeliranje kromatina SWR1 i modul za regrutiranje koji potiče interakciju s transkripcijskim aktivatorima. Mehanizam suradnje ovih različitih modula do danas nije potpuno razjašnjen (Setiাপutra *et al.*, 2018).

## 1.2. Protein Taf14 i domena YEATS

Protein Taf14 (engl. *TBP-associated factor 14*) je transkripcijski faktor koji se u literaturi spominje i kao Anc1, Taf30, Tfg3 i Swp29. Pod imenom Anc1, protein Taf14 je prvotno identificiran 90-ih godina u studiji mutacija aktina (Welch *et al.*, 1993) i ustanovljena je njegova uloga u aktinskom citoskeletu i sličnost sekvence s ljudskim ENL i AF9 koji su povezani s akutnim limfoblastičnim i mijeloidnim anemijama i limfomima (Welch i Drubin, 1994, Cairns *et al.*, 1996).

Poznato je da Taf14 stupa u fizičku interakciju sa sedam kompleksa u stanici i sudjeluje u transkripciji kao dio općih transkripcijskih faktora TFIID i TFIIF te u kompleksu Medijator, preinaci kromatina (kompleksi INO80, RSC, SWI/SNF) i modifikaciji histona (kompleks acetiltransferaze NuA3). Taf14 kao podjedinica ovih kompleksa nema ulogu u katalitičkoj aktivnosti, ali njegov izostanak dovodi do destabilizacije kompleksa (Cairns *et al.*, 1996; Erlich *et al.*, 2008). Kabani i suradnici (2005) mapirali su i točne regije podjedinica većine kompleksa koji stupaju u interakciju s Taf14 (slika 3.), a druga skupina autora je pokazala da je za interakciju ključan C-terminus proteina Taf14 (Shultze *et al.*, 2010).



Slika 3. Interakcijski partneri proteina Taf14 (Anc1) dobiveni metodom dvaju hibrida. Vrijednosti u zagradama odnose se na aminokiseline i predstavljaju minimalnu interakcijsku regiju. Preuzeto i prilagođeno iz Kabani *et al.*, 2005.

Genska sekvenca *TAF14* sadrži 840 nukleotida s jednim intronom (9-115 nt) te kodira za ukupno 244 aminokiseline. Mutanti s potpuno izbrisanim uputom za *TAF14* (*null*-mutanti) pokazuju sporiji rast u normalnim uvjetima, osjetljivi su na povišene temperature (izostaje rast na 37 °C) i izlaganje tvarima koje dovode do oštećenja DNA (hidroksiurea, bleomicin) (Shanle *et al.*, 2015). Poznate su njegove regulatorne uloge u različitim fiziološkim procesima, ali još nisu precizno opisani detalji mehanizma njegova djelovanja.

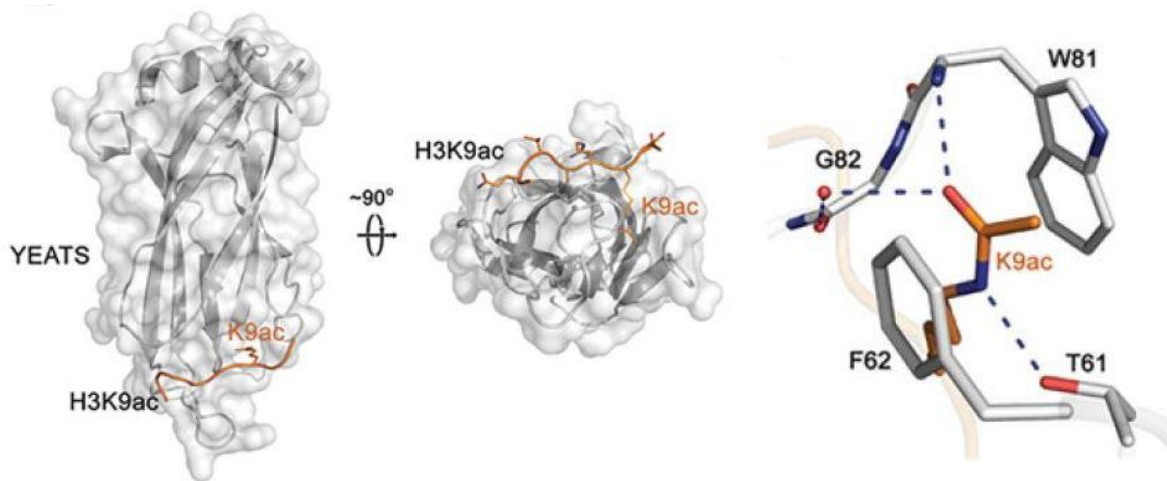
Protein Taf14 dio je obitelji proteina s domenom YEATS koja je dobila ime po prvim identificiranim članovima Yaf9, ENL, AF9, Taf14 i Sas3 (Schulze *et al.*, 2009). Kod kvasca *S. cerevisiae* u ovu skupinu pripadaju proteini Taf14, Sas5 i Yaf9, dok *Candida albicans* kodira za Taf14 i Yaf9. Radi se o konzerviranoj domeni, a važno je napomenuti da, iako kod čovjeka postoje proteini s domenom YEATS (GAS41, AF9, ENL), direktni homolozi s kvašćevim YEATS-proteinima nisu pronađeni.

Domena YEATS od prosječno 80-ak aminokiselina nalazi se na N-terminusu proteina i karakteristično se javlja u samo jednoj kopiji. Funkcija domene YEATS je povezana s preinakom kromatina, modifikacijama histona i transkripcijom (Schulze *et al.*, 2009). Kod kvasca *S. cerevisiae*, sva tri YEATS-proteina su neesencijalna. Prema Zhangu i suradnicima (2004), delecije po bilo koja dva člana obitelji YEATS dovode do usporavanja rasta, a deletiranje sva tri je letalno. Ipak, novija istraživanja su pokazala da je za spašavanje trostrukog mutanta dovoljno eksprimirati tek krnju verziju proteina Taf14 koja sadrži samo njegov C-terminus, ne i domenu YEATS (Peil *et al.*, 2020).

Kontrola transkripcije preinakom kromatina i modifikacijama histona je dobro poznati mehanizam kontrole ekspresije gena. Gusto pakirani kromatin i deacetilirani histoni zatvaraju pristup transkripcijskoj mašineriji te ne dolazi do ekspresije gena. Među dobro istraženim posttranslacijskim modifikacijama (PTM) su svakako acetilacije, fosforilacije, sukcinilacije i ubikvitinacije, a u novije vrijeme je interes znanstvene zajednice usmjeren i na modifikacije krotonilnom skupinom. Moguću funkciju domene YEATS predložili su Li i suradnici (2014) na temelju genetičke analize koja je upućivala da se domena YEATS veže na acetilirane lizine na histonima i tako olakšava regrutaciju drugih proteina i kompleksa.

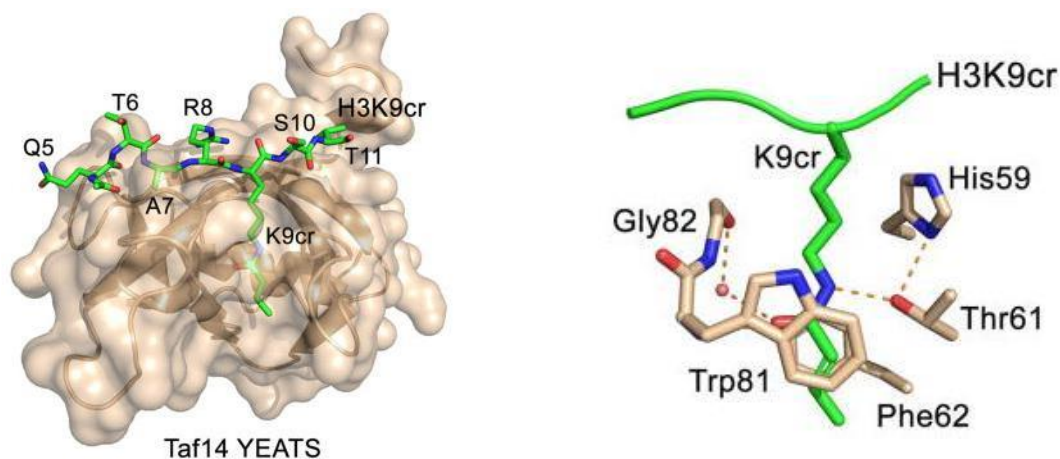
Istraživanja grupe Strahl pokazala su da Taf14, odnosno njegova domena YEATS, stupa u interakciju s acetiliranim histonom H3 (Shanle *et al.*, 2015), a kasnije i da je važan "čitač" modifikacije krotonilnom skupinom na H3K9 (Andrews *et al.*, 2016). Tercijarna struktura domene YEATS oblikuje strukturu izduženog  $\beta$ -sendviča od 8 antiparalelnih  $\beta$ -lanaca i zavoja, s dvije kratke  $\alpha$ -zavojnice na N- i C-terminusu (Zhang *et al.*, 2011). Domena YEATS proteina Taf14 veže acetilirani lizin histona H3 (H3K9ac) u tzv. aromatski kavez među 4 aromatske aminokiseline H59, F62, W81, G82 i treonin T61 (slika 4.). Mutacijom i uvođenjem alanina na poziciju 81 (W81A) dolazi do izostanka interakcije (Shanle *et al.*, 2015, Andrews *et al.*, 2016).

Planarna krotonilna skupina prolazi kroz tunel  $\beta$ -sendviča domene YEATS i precizno se pozicionira između ogranaka Trp81 i Phe62 koji su nasuprot jedan drugom i na jednakoj udaljenosti od krotonilne skupine (slika 5.). Ovaj tip vezanja (aromatski-amidni/alifatski-aromatski) naziva se  $\pi$ - $\pi$ - $\pi$  slaganjem i upravo je na ovom primjeru prvi put opisan. Domena YEATS proteina Taf14 preferentno veže krotonilirani H3K9, i ovo vezanje je jače nego na acetilirani, propionilirani i butilirani oblik H3K9 (Andrews *et al.*, 2016, Klein *et al.*, 2018). Krotonilnom skupinom su obogaćene regije promotora aktivnih gena i nekih pojačivača i smatra se da potiče transkripciju gena jače nego dobro poznata acetilacija (Sabari *et al.*, 2015).



Slika 4. Struktura domene YEATS s vezanim H3K9ac. Desna slika prikazuje aromatski kavez, plavim isprekidanim linijama prikazane su vodikove veze. Preuzeto i prilagođeno iz Shanle *et al.*, 2015.





Slika 5. Kristalna struktura vezanja domene YEATS i krotoniliranog lizina histona H3 (H3K9cr). Desna slika prikazuje karakteristično  $\pi$ - $\pi$ - $\pi$  slaganje krotoniliranog lizina. Preuzeto i prilagođeno iz Andrews *et al.*, 2016.

Domena YEATS proteina Taf14 svakako ima atraktivne uloge u stanici, ali nije nužna za rast. Kako je pokazano, krnja inačica *TAF14* koja eksprimira samo YEATS domenu, pokazuje lošiji rast nego mutanti *taf14Δ* pa je vjerojatno da djeluje kao negativni regulator rasta (Schulze *et al.*, 2014). Za interakciju s transkripcijskim kompleksima i kompleksima za preinaku kromatina, nužna je C-terminalna domena, dok domena YEATS nije nužna (Schulze *et al.*, 2010). Mutanti s deletiranom domenom YEATS po nekim istraživanjima ne pokazuju posebne fenotipove (Peil *et al.*, 2020), dok mutanti domene na C-kraju proteina ne rastu kad ih se izloži stresovima (formamid i HU) (Zhang *et al.*, 2011).

Također, jedno novije istraživanje daje novu perspektivu o mogućim ulogama proteina Taf14 i njegovih domena. Peil i suradnici (2020) u svom radu iznose dokaze da specifično vezanje domene YEATS proteina Taf14 na acetilirani i krotonilirani H3K9, iako dokazano *in vitro*, nije ključna meta *in vivo*. Nadalje, iznose i rezultate koji upućuju da domena YEATS proteina Taf14 sudjeluje u formiranju predinicijacijskog kompleksa (PIC) kao dodatni stabilizator vezanja TFIID i TFIIF na kompleks.

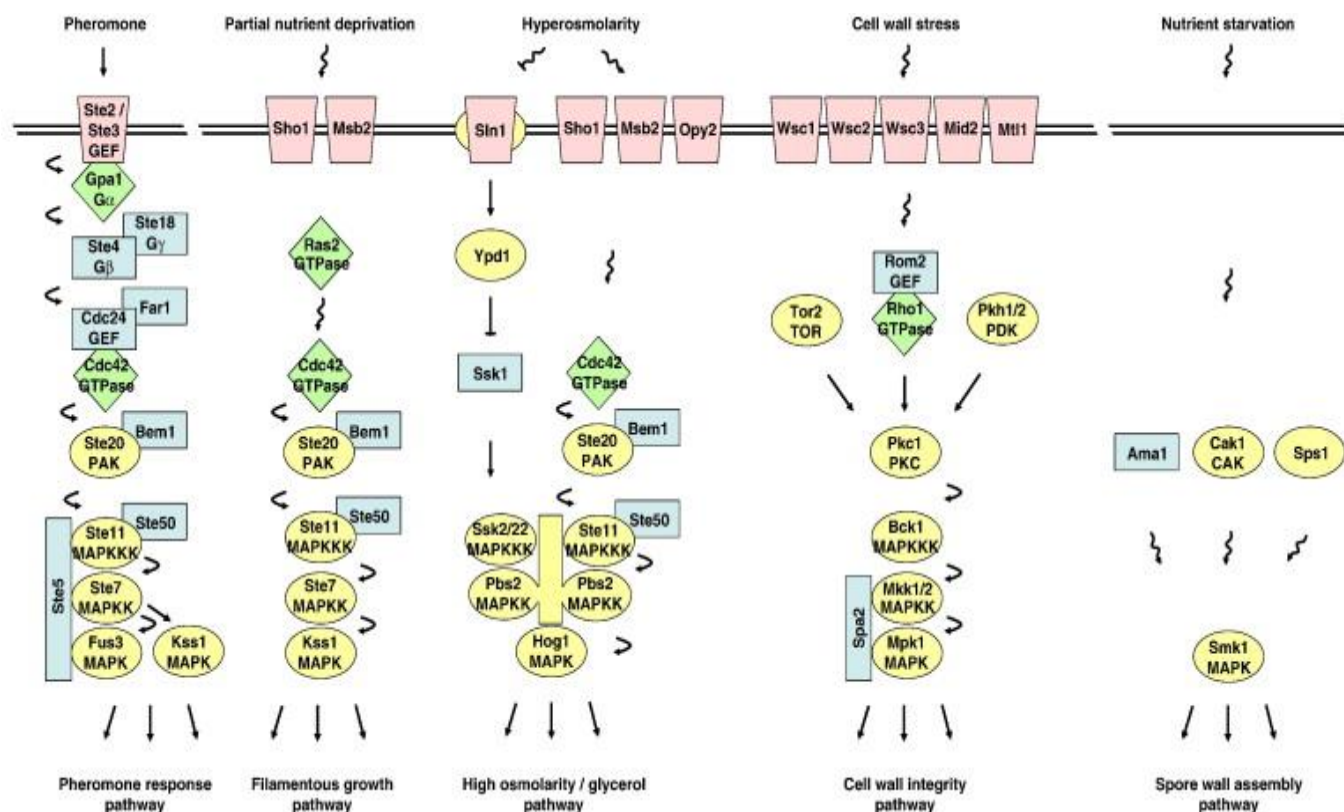
Činjenica da protein Taf14 djeluje kao neesencijalna, ali ipak stabilizacijska podjedinica u važnim kompleksima i čije se uloge miješaju s više signalnih puteva, uvelike otežava istraživanje jer se uočena odstupanja ili fenotipovi ne mogu direktno pripisati ovoj komponenti (Chen *et al.*, 2020).

### 1.3. Stanični stres

Stanje homeostaze održava se fino usklađenim mehanizmima koji djeluju i surađuju da bi osigurali precizno funkcioniranje nekog organizma. Također, kod promjene idealnih, odnosno fizioloških, uvjeta brojni mehanizmi odgovaraju na te promjene s ciljem da organizam i dalje neometano obavlja sve funkcije. Postoji više definicija staničnog stresa, npr. Dawes i Perrone (2020) u svom pregledu istraživanja stresa i starenja kod kvasca definiraju stres kao štetan okolišni ili fiziološki uvjet koji može utjecati na normalnu ravnotežu u organizmu. Općenito, možemo reći da se radi o neravnoteži ili narušavanju stanja homeostaze.

Pojam staničnog stresa većinom asocira na oštećenja DNA, UV zračenja, replikacijski stres, oksidacijski stres, osmotski stres, promjene pH vrijednosti i temperature, ali ne smijemo zaboraviti da "osjetljivost" stanice seže do promjene koncentracije jedne aminokiseline u sastavu hranjivog medija (Lee *et al.*, 2013).

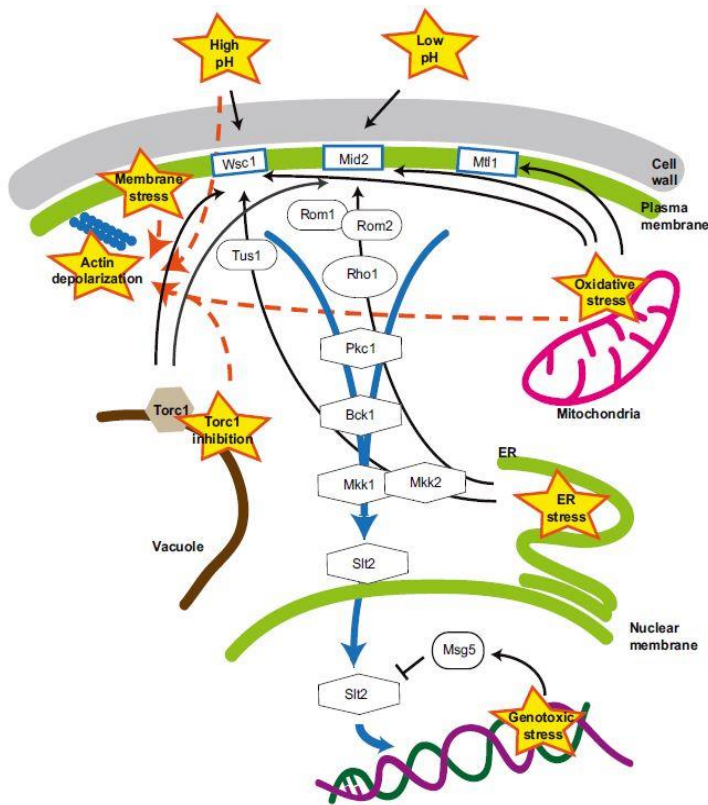
Brojni su mehanizmi kojima stanica detektira oštećenja, potom popravi oštećenja ili (nekad samoubilačkim mehanizmima) zaustavi prijenos oštećenja na potomstvo. Kako bi preživjela, stanica mora adekvatno i učinkovito prepoznati signale iz okoliša, reagirati i prilagoditi se nastalom stresu odnosno promjenama. Mehanizam koji je uključen u taj proces je i kaskada mitogenom aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK) koja je prvotno otkrivena i najbolje istražena upravo na kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Kao jednostavan eukariot i prvi eukariot kojemu je sekvenciran cijeli genom, pekarski kvasac je model na kojemu je detaljno istražen mehanizam MAPK-kaskada koji je evolucijski očuvan kod eukariota, od kvasca do čovjeka. Različite vrste promjena u okolišu pokreću različite vrste odgovora u stanici, ali većinom se oslanjaju na princip "pojačavanja" signala upravo kaskadom MAPK (slika 6.; Chen i Thorne, 2007). Signale iz okoliša stanice, poput manjka ili potpunog nedostatka hranjivih tvari, ugroze stanične stijenke ili hiperosmolarnosti, detektiraju proteini na površini stanice. Ovisno o vrsti signala, pojedini proteini aktiviraju GTP-vezujuće proteine ili direktno neke kinaze proteina. Potom se fosforilacijom aktivira niz proteina (MAPK kaskada) te se pokreće neki od signalnih puteva za odgovor na promjenu u okolišu - npr. put integriteta stanične stijenke, filamentacije ili aktivacije spora. Rezultat ovih staničnih procesa je većinom aktivacija transkripcije gena potrebnih za odgovor na promjenu u okolišu. Detaljnije o nekim od procesa će se pisati dalje u tekstu.



Slika 6. Shematski prikaz signalnih puteva koji koriste kaskadu MAPK kod *S. cerevisiae*. Simboli: ružičastim trapezoidima označeni su proteini na površini stanice, zelenim rombovi proteini koji vežu GTP, žutim ovalnim oblikom označene su proteinske kinaze, a plavim kvadratima strukturalni, pomoćni i aktivatorski proteini. Strelice označavaju aktivaciju, a tupe strelice (T oblika) inhibiciju, vijugave strelice označavaju posrednu aktivaciju ili nepoznat mehanizam aktivacije. Shema je pojednostavljena pa su neki mehanizmi, kao i veze među prikazanim mehanizmima izostavljeni radi jasnoće i preglednosti. Preuzeto iz Chen i Thorner, 2007.

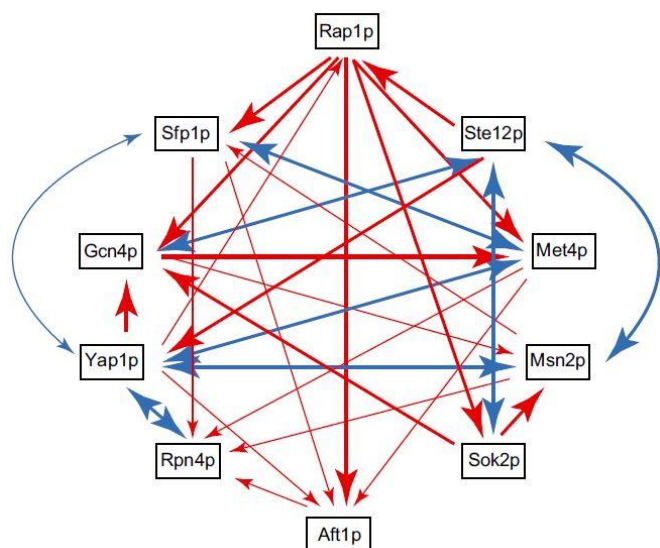
Na shematskom prikazu signalnih puteva koji koriste kaskade MAPK (slika 6.) vidljivo je da neki proteini sudjeluju u više signalnih puteva. Važno je napomenuti i da se signalni putevi ne aktiviraju samo jednom vrstom podražaja i da nisu neovisni jedan o drugom već se radi o mreži isprepletenih signalnih puteva koji su fino usklađeni kako bi rezultirali što boljim odgovorom i ishodom za stanicu. Jimenez-Gutierrez i suradnici (2019) u svom pregledu o istraživanjima puta integriteta stanične stijenke, napominju kako brojni podražaji koji nisu izravno povezani sa staničnom stijenkom (pogrešno smotani proteini, visoke ili niske vrijednosti pH, stres koji djeluje na plazma membranu i genotoksični i oksidativni stres) aktiviraju upravo put integriteta stanične stijenke (slika 7.). Zanimljiv je i podatak koji iznose Lee i suradnici (2013) u svom istraživanju promjene ekspresije gena kod povećane koncentracije L-serina kod kvasca *S. cerevisiae*. U analizi aktiviranih i reprimiranih transkripcijskih faktora navode da se u svim

stresom aktiviranim i isprepletenim mehanizmima, ipak ističe desetak proteina koji su zaslužni za većinu (90 %) rada na očuvanju homeostaze i integriteta genoma kod kvasca. Drugim riječima, tih deset transkripcijskih faktora (Sfp1, Gcn4, Yap1, Ste12, Met4, Msn2, Sok2, Rpn4, Rap1 i Aft1) djeluju jedan na drugog i tako reguliraju većinu odgovora na promjene s kojima se stanica susreće, djelujući kao centralna kontrolna soba za odgovor stanice na stres (slika 8.).



Slika 7. Shematski prikaz različitih vrsta stresa koji aktiviraju signalnu kaskadu MAPK i put CWI (engl. *Cell Wall Integrity*). Isprekidane crvene linije označavaju isprepletene puteve različitih vrsta stresa. Preuzeto iz Jimenez-Gutierrez *et al.*, 2020.

Slika 8. Interakcije transkripcijskih faktora koji reguliraju 90 % gena promijenjene ekspresije nakon dodavanja L-serina. Crvena boja označava transkripcijski faktor koji regulira ciljni gen drugog faktora, a plava boja označava faktore koji međusobno reguliraju gene (jedan drugom). Preuzeto iz Lee *et al.*, 2013.

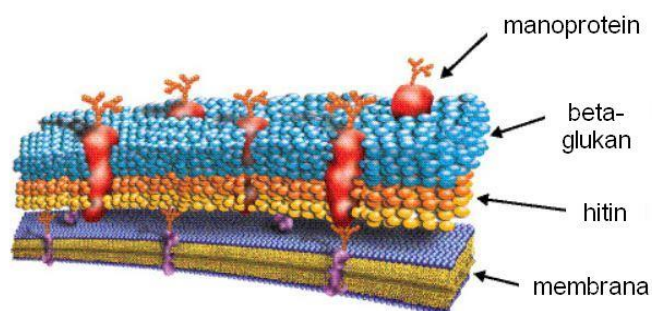


## 1.4. Stanična stijenka

Prema biološkoj klasifikaciji, kvasci pripadaju carstvu gljiva (lat. *Fungi*), ali se morfološki razlikuju od ostalih pripadnika ove skupine. Radi se o jednostaničnim eukariotima, okruglasta oblika promjera 5-10  $\mu\text{m}$  koje u prirodi nalazimo na površini biljaka. Ključnu ulogu u očuvanju staničnog integriteta kvasca i odgovoru na promjene u okolišu igra stanična stijenka kvasaca. Iako je njena struktura rigidna, stanična stijenka se dinamično prilagođava ne samo promjenama u okolišu, već se mijenja i kroz stanični ciklus i diobu kvasca.

Stanična stijenka kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čini oko 20 % suhe mase kvasca (Aguilar-Uscanga i François, 2003). Postoji nekoliko važnih uloga ovog organela među kojima je održavanje osmotskih uvjeta unutar stanice i fizička zaštita od mehaničkih oštećenja. Obzirom da je osmolarnost unutar stanice veća nego u okolini, stijenka čuva stanicu od prodora vode iz citoplazme koji bi doveo do oštećenja i pucanja stanice. Nadalje, stijenka održava oblik stanice i tijekom morfogeneze i filamentacije kada dolazi do velikih kontroliranih promjena stanične stijenke. Također, sam sastav stanične stijenke ograničava permeabilnost stanice za makromolekule (Klis *et al.*, 2006).

Stanična stijenka kvasca sastoji se od unutarnjeg i vanjskog sloja (slika 9.). Unutarnji sloj čine glukanski polimeri i hitin. Lanci  $\beta$ -1,3-glukana čine 80-90 % ovog sloja,  $\beta$ -1,6-glukan zauzima 8-18 %, dok hitinski dio čini tek 2 %. Struktura  $\beta$ -1,3-glukana zaslužna je za čvrstoću i elastičnost stanične stijenke. Vanjski sloj sastoji se od glikoziliranih manoproteina koji štite unutarnji sloj od enzima za razgradnju, sudjeluju u prepoznavanjima stanice i formiranju biofilmova. Glikoproteini koje nalazimo u ovom sloju većinom pripadaju proteinima GPI (glikozilfosfatidilinozitol) ili skupini Pir proteina (Levin, 2005).



Slika 9. Shematski prikaz stanične stijenke kvasca. Uz membranu se nalaze hitinski i  $\beta$ -glukanski sloj u koje su usidreni manoproteini. Preuzeto i prilagođeno s internetske stranice [1].



#### 1.4.1. Signalni put CWI

Sastav stanične stijenke mijenja se ovisno o potrebama stanice i regulira ga pretežno signalni put CWI (engl. *Cell Wall Integrity*). Stanica će na stres stanične stijenke reagirati aktivacijom puta CWI koji će potaknuti sintezu sastavnica stanične stijenke i vezanje (cross-linking) novosintetiziranih sastavnica s postojećim (Orlean, 2012). Signalni put CWI sudjeluje i u regulaciji rasta i diobe stanica tijekom staničnog ciklusa, formiranja pupova, morfogeneze aktivirane feromonima, sporulacije i rasta pseudohifa (Levin, 2011).

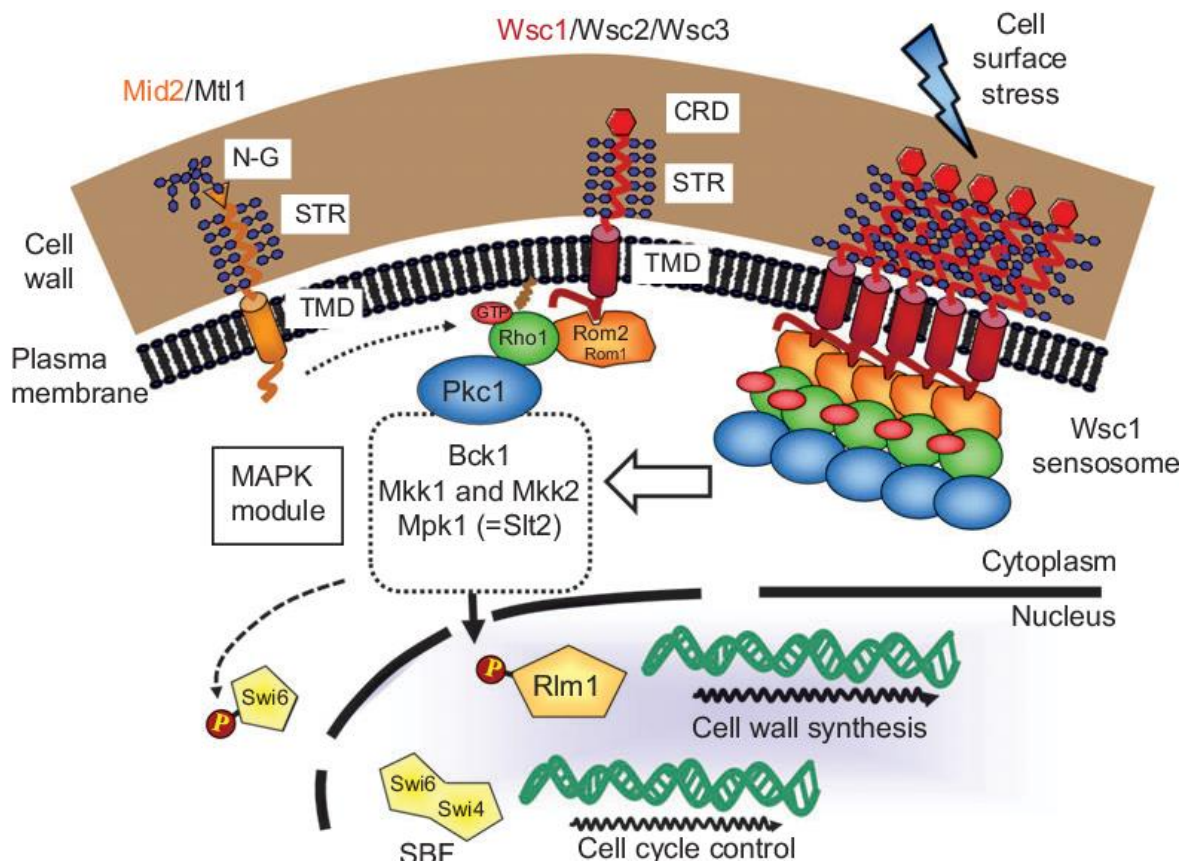
Pri površini stanice nalaze se senzorske molekule Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 i Mtl1 (slika 10.). Ovo su proteini plazma membrane čija je uloga detektiranje i prijenos signala o oštećenju odnosno stresu stanične stijenke. Svi imaju sličnu strukturu koja se sastoji od kratke citoplazmatske domene na C-terminusu, transmembranske domene i periplazmatske ektodomene koja je bogata serinskim i treoninskim bočnim ograncima. Ipak, njihove sekvence nisu konzervirane, a temeljna strukturna razlika je u području N-terminusa. Proteini Wsc ovdje sadrže domenu bogatu cisteinom (CRD, engl. *cystein-rich domain*) koju još nazivamo domena WSC, dok Mid2 i Mtl1 na tom dijelu imaju N-glikozilirani asparagin (Philip i Levin, 2001; Levin, 2011).

Spomenuta domena na C-terminusu senzorske molekule dalje stupa u interakciju s N-terminusom proteina Rom2 iz skupine GEF (engl. *guanine exchange factor*). Istovremeno, Rom2 svojom domenom DH (engl. *Dbl homology*) može aktivirati GTP-azu Rho1. Protein Rho1 je pod regulacijom više proteina iz skupine GEF (Rom1, Rom2 i Tus1) te skupine GAF (engl. *GTP-ase activating factor*, Bem2, Sac7, Bag7 i Lrg1). Aktivatorske molekule Rom1 i Rom2 pretežno prenose signale o oštećenju stanične stijenke od površinskih senzorskih molekula, a Tus1 je nužan za regulaciju Rho1 u G1/S tranziciji tijekom staničnog ciklusa (Levin, 2011; Kono *et al.*, 2008).

Kada se radi o prijenosu poruke o stresu stanične stijenke, aktivirana GTP-aza Rho1 dalje pokreće protein kinazu C (PKC) koja će pokrenuti kaskadu MAPK i aktivirati redom MAPKKK Bck1, MAPKK Mkk1 i Mkk2 te MAPK Mpk1/Slt2. Fosforilirani Slt2 ulazi u jezgru gdje aktivira transkripcijske faktore poput Rlm1 i kompleksa SBF i MBF te se aktivira transkripcija gena važnih za staničnu stijenku. Transkripcijski faktor Rlm1 regulira preko 25 gena od kojih je većina povezana s biogenezom stanične stijenke (Jung i Levin, 1999). Neki od gena čiju transkripciju aktivira signalni put CWI su gen *FKS2* koji kodira za katalitičku podjedinicu

$\beta$ -1,3-glukan sintaze i gen *CRHI* koji kodira za transglikozilazu hitina. Stvaranjem ovih enzima, djelovat će se na samu arhitekturu stanične stijenke te će doći do preinaka u vezama i rasporedu njenih komponenti.

Ovdje je prikazan jedan dio signalnih puteva koji su uključeni u održavanje homeostaze stanične stijenke. Kao što je već spomenuto, GTP-aza Rho1, jedna od ključnih molekula u ovom putu, je pod utjecajem aktivacije više GEF i GAF-molekula, a opisano je šest molekula na koje ona dalje može utjecati (*Pkc1*, *GS*, *Bni1* i *Bnr1*, *Sec3* i *Skp7*) i tako usmjeravati odgovor stanice (Levin, 2011). Svi procesi su strogo regulirani i vremenski i prostorno.

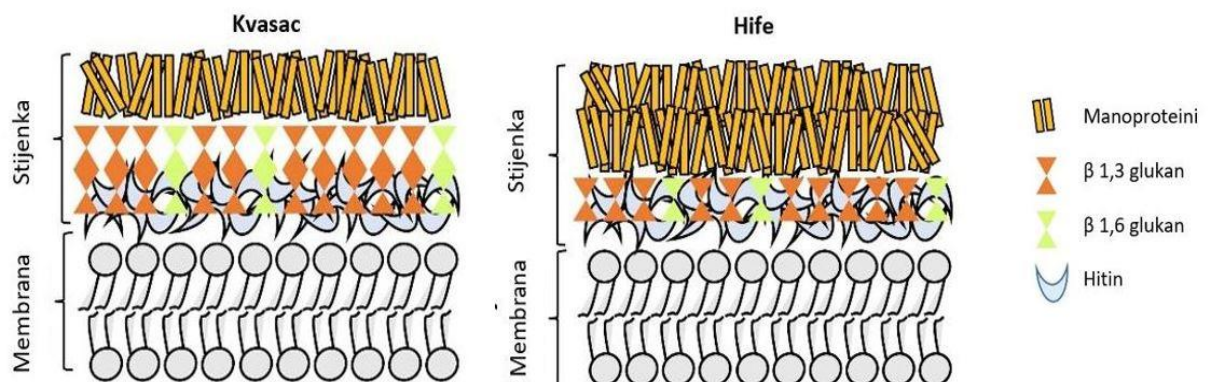


Slika 10. Put integriteta stanične stijenke (CWI) kod *S. cerevisiae*. Prikazane su senzorske molekule pri površini stanice i pojednostavljena shema prijenosa signala i aktivacije kaskade MAPK koja dovodi do aktivacije transkripcijskih faktora i aktivacije gena uključenih u sintezu komponenti stanične stijenke i kontrolu staničnog ciklusa. Simboli: TMD, transmembranska domena; STR, Ser/Thr-bogata regija (plavi heksagoni označavaju O-manozilaciju); CRD, domene bogate cisteinom; N-G, N-glikozilirani asparagin. Preuzeto iz Merzendorfer, H. i Heinisch, J. J. (2013).

#### 1.4.2. Stanična stijenka gljivice *C. albicans*

Gljivica *Candida albicans* nastanjuje sluznice i prisutna je u gastrointestinalnom i genitourinarnom traktu, usnoj šupljini i koži zdravog čovjeka. Međutim, poremećaji u sastavu mikrobioma mogu dovesti do prerasta ove gljivice i uzrokovati infekcije koje kod imunokompromitiranih pojedinaca mogu biti i životno ugrožavajuće. Ključni faktor koji normalnog stanovnika ljudskog organizma pretvara u patogenog i omogućuje stvaranje biofilma je sposobnost gljivice *C. albicans* da raste u obliku okruglog kvasca, ovalnih pseudohifa i izduženih hifa (slika 11.; Nobile i Johnson, 2015; Mayer *et al.*, 2013). Morfogeneza *C. albicans* posljedica je preinaka u sastavu stanične stijenke.

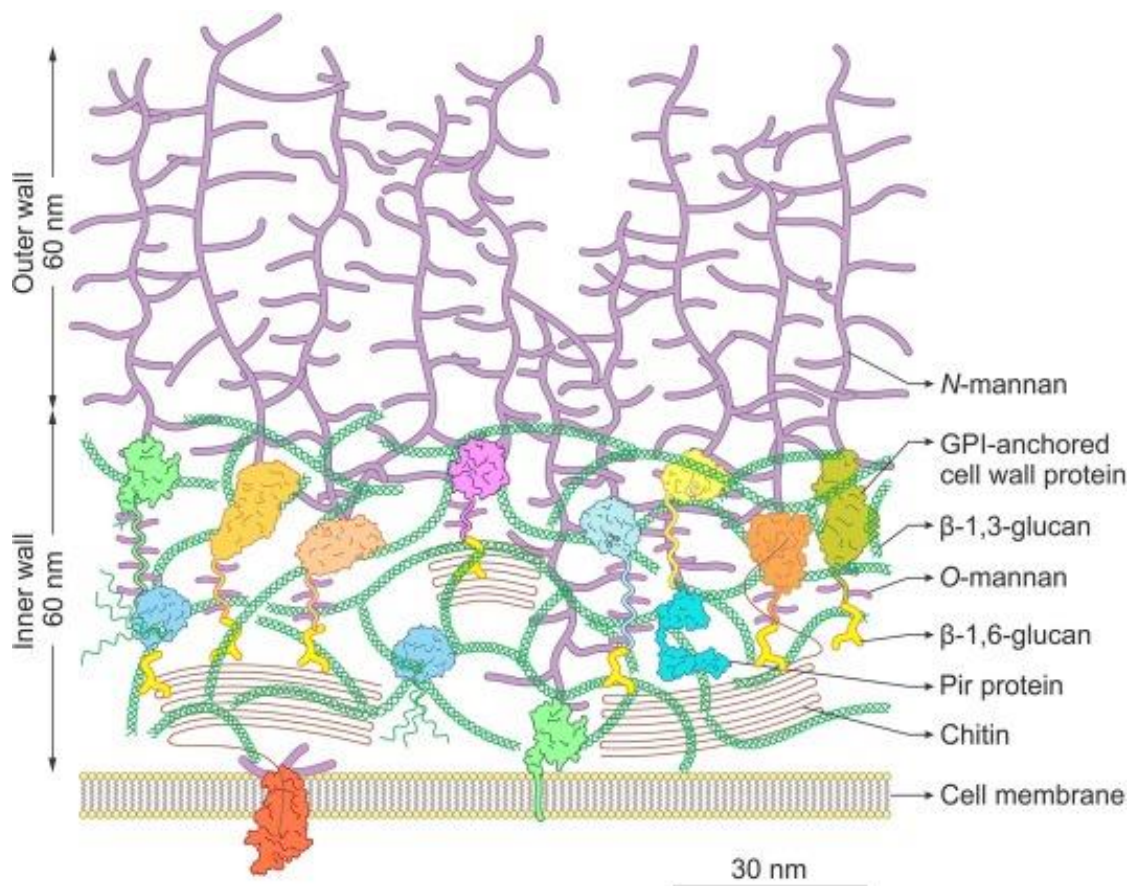
Stanična stijenka gljivice *C. albicans* sastoji se, kao i kod ostalih kvasaca i gljivica, od dva sloja s osovinom od  $\beta$ -glukana i hitina koji daju čvrstoću i oblik i koji, prema većini modela, predstavljaju unutarnji sloj stijenke (Bowman and Free, 2006, Gow *et al.*, 2017). Proteini stanične stijenke (CWP; engl. *cell wall proteins*) su manozilirani i većinom su vezani za strukturne polisaharide GPI-vezama (Gow *et al.*, 2017, Latgé, 2007). Ovi proteini su obogaćeni N- i O-mananima. N-manani su razgranate strukture s bočnim lancima različitih dužina, dok su O-manani jednostavniji linearni lanci (Hall i Gow, 2013). Manani ne utječu na oblik stanice, već tvore nepropusni i neporozni dio stijenke koji doprinosi otpornosti na antimikotike i domaćinove mehanizme obrane (Gow i Hube, 2012).



Slika 11. Pojednostavljeni prikaz sastava stanične stijenke gljivice *Candida albicans*. Lijevi prikaz prikazuje shemu stanične stijenke kada je gljivica u obliku kvasca, a desni prikaz kad je u obliku hifa. Sloj stijenke izložen okolini tada obiluje manoproteinima i tako maskira  $\beta$ -glukan koji je lako prepoznatljiva meta imunološkog sustava domaćina i terapijska meta. Ovako *C. albicans* postiže maskiranje i izbjegavanje imunološkog sustava domaćina te stvara infekcije. Preuzeto i prilagođeno iz Garcia-Rubio, 2020.



Nedavno istraživanje grupe Gow donosi i detaljnu strukturu stanične stijenke dobivenu elektronskom mikroskopijom (slika 12.). Autori predlažu da unutarnji sloj stanične stijenke čine hitin,  $\beta$ -glukani, proteini stanične stijenke s GPI-sidrima te lanci O- i N-manana. Vanjski sloj, prema njihovom modelu, čine sami bočni lanci N-manana. Također, ističu da hitinski dio nije definiran sloj, već je raspršen po unutarnjem sloju, kao i proteini. U standardnim uvjetima, prema njihovom modelu, kada *C. albicans* raste u obliku kvasca, svaki od slojeva je debljine oko 60 nm (Lenardon *et al.*, 2020).



Slika 12. Model stanične stijenke *C. albicans* prema novijim istraživanjima. Unutarnji sloj čine hitin,  $\beta$ -glukani i proteini stanične stijenke. Vanjski sloj čine lanci manana. Svaki sloj je, u standardnim uvjetima, debljine oko 60 nm. Preuzeto iz Lenardon *et al.*, 2020.

## 1.5. Filamentacija

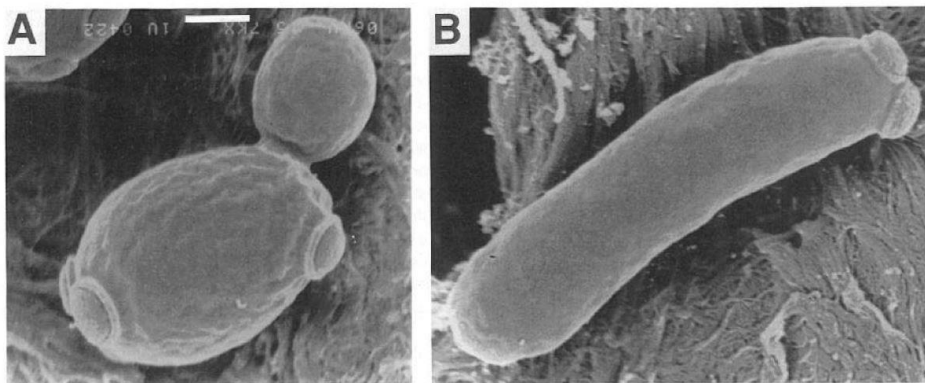
Filamentacija je proces u kojem stanice potaknute vanstaničnim podražajem mijenjaju svoje morfološke karakteristike kako bi se širile okolišem odnosno staništem. Današnje znanje o filamentaciji većinom je rezultat istraživanja i želje za razumijevanjem patogenih gljivica (Cullen i Sprague, 2012). Kod gljivice *C. albicans* je upravo promjena u filamentacijski način rasta ključni faktor za virulenciju (Lo *et al.*, 1997) i ovisi od brojnim vanjskim faktorima poput temperature i dostupnim hranjivim tvarima (Berman, 2006). Pokazano je da patogenost *C. albicans* ovisi o više povezanih procesa među kojima su preinake površine stanice (Nather i Munro, 2008), prijanjanje na stanicu domaćina odnosno adhezija (Latge, 2010), stvaranje biofilma (d'Enfert, 2009) i reorganizacija kromatina (Selmecki *et al.*, 2010).

Kvasac *S. cerevisiae* se pokazao kao jednostavan i pouzdan model za istraživanje, a identificirani genetički putevi koji sudjeluju u procesu filamentacije doprinijeli su razumijevanju patogenih gljivica. Filamentacija je normalan dio životnog ciklusa kvasca, ali ovdje se ne radi o stvaranju višejezgrenih hifa. Naime, stanice se potpuno odvajaju jedna od druge citokinezom, ali ostaju vezane proteinima stanične stijenke i stvaraju pseudohife. Također, dolazi do izduživanja stanice koje je rezultat zaostajanja u staničnom ciklusu te do promjene polarnosti stanice (Cullen i Sprague, 2012; Cullen, 2015). Polarnost stanice određena je specijaliziranim proteinima (engl. *bud-site-selection proteins*) koji vezanjem usmjeravaju rast stanice (Park i Bi, 2007). Iako haploidne stanice pupaju aksialno, a diploidne bipolarno, za vrijeme filamentacije, oba tipa stanica pokazuju distalno unipolarno pupanje posredovano proteinom Bud8 (Harkins, 2001).

Ključan faktor koji dovodi do rasta pseudohifa je ograničen izvor nutrijenata, prvenstveno dušika i ugljika. Filamentacija je kvascu, koji je nepokretan organizam, način traženja povoljnijeg okoliša s boljim izvorima hranjivih tvari. Pupajući kvasci (engl. *budding yeast*) mogu stvarati filamente kao haploidi i diploidi, ali postoje razlike u mehanizmima koji iniciraju i provode ovaj proces. Haploidi pokazuju fenotip prodiranja u podlogu kada su izloženi niskim izvorima šećera pa se ovdje zna govoriti o invazivnom rastu, dok se za diploide govori o rastu pseudohifa (Cullen i Sprague, 2012). Isto tako, u nekim znanstvenim člancima se posebno ističe pseudohife kod nepatogenih kvasaca i tako ih se razlikuje od filamenata kod patogenih gljivica, dok se oba procesa nazivaju filamentacijom. Također, važno je napomenuti da pojam "filamentacija kod kvasaca" nije uvriježen u literaturi na hrvatskom jeziku. U ovom radu je pojam "filamentacija" korišten prema upotrebi pojma *filamentation* u engleskom jeziku (u

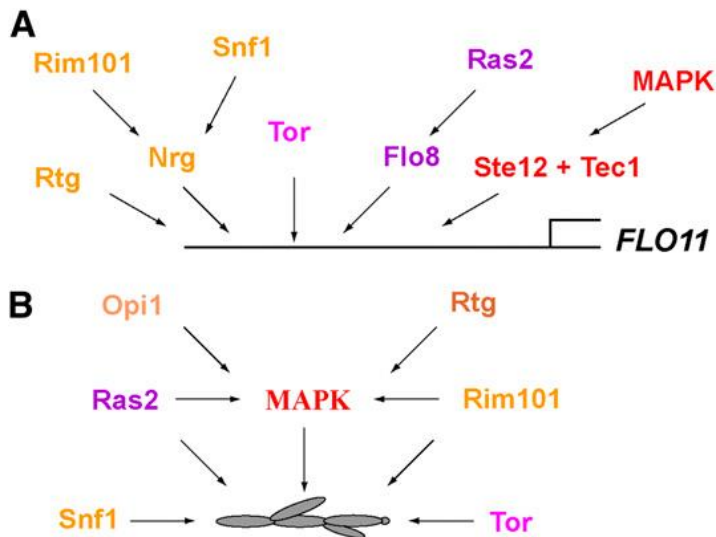
literaturi iz ovog znanstvenog područja) te se odnosi na stvaranje filamenata i na stvaranje pseudohifa.

Sposobnost kvasca *S. cerevisiae* da stvara filamente neko vrijeme nije bila u fokusu znanstvene zajednice jer je većina laboratorijskih sojeva izgubila tu sposobnost. Grupa Fink je 1992. godine objavila rezultate istraživanja divljeg tipa soja  $\Sigma 1278b$  čije kolonije su, na podlozi s ograničenim hranjivim tvarima, tvorile izdužene stanice koje su rasle u lancima (slika 13.). Smatralo se da je filamentacija način pretraživanja okoliša za hranjivim tvarima, a Fink i suradnici su pokazali da kvasci koji ne mogu koristiti amonijak pokazuju hiperfilamentacijski fenotip i tako povezali utjecaj dostupnosti dušika s filamentacijom (Gimeno *et al.*, 1992). Kasnije se ustanovilo i da je manjak izvora fermentabilnog ugljika povezan s filamentacijom (Cullen i Sprague, 2000).



Slika 13. Morfologija kvasca *S. cerevisiae* u standardnim (A) i uvjetima s ograničenim izvorom hranjivih tvari (B). Prikazan je rezultat analize pomoću SEM (engl. *scanning electron microscope*). U standardnim uvjetima, kvasac je u karakterističnom ovalnom obliku s vidljivim pupom i ožiljcima od pupanja (bipolarno). Izložena gladovanju, stanica kvasca se izdužuje u pseudohifu koja pupa unipolarno (dva vidljiva ožiljka od pupanja na jednom polu). Skala odgovara dužini od 1  $\mu\text{m}$ . Preuzeto iz Gimeno i Fink, 1992.

Istraživanje grupe Fink pokazalo je i da GTP-aza Ras2, opći regulator, ima važnu ulogu u filamentaciji pa tako sojevi s trajno aktiviranim Ras2 pokazuju značajno povećanu filamentaciju. Kada govorimo o regulaciji procesa filamentacije, barem su četiri signalna puta uključena u ovaj proces: signalni put RAS/PKA (engl. *rat sarcoma/protein kinase A*), signalni put SNF (engl. *sucrose nonfermentable*), signalni put TOR (engl. *target of rapamycin*) i signalni put MAPK (Cullen i Sprague, 2012).



Slika 14. Integracija signalnih puteva i regulatornih proteina koji sudjeluju u filamentaciji. (A) Više signalnih puteva dolazi do promotora gena *FLO11* i tako utječu na ekspresiju gena. (B) Dio signalnih puteva regulira aktivnost puta MAPK. Preuzeto iz Cullen i Sprague, 2012.

Do danas nije detaljno razjašnjen mehanizam regulacije filamentacije i način na koji se brojni signalni putevi ujedinjavaju i sinkroniziraju u jedinstven i najpovoljniji odgovor, ali jasno je da je signalni put MAPK (često nazivan i fMAPK; filamentacijski MAPK) jedan od ključnih mehanizama. Neke od meta signalnog puta MAPK koje pozitivno reguliraju filamentaciju su: *BUD8* koji kodira protein uključen u odabir lokacije pupanja na distalnom polu; *FLO11* za flokulin koji je ključan za adheziju stanica i *CLN1* koji kodira ciklin faze G1 i čija indukcija dovodi do zaostajanja staničnog ciklusa i posljedičnog izduživanja stanice (Vandermeulen i Cullen, 2020).

Dobro proučen gen *FLO11* koji kodira flokulin važan za adheziju stanica i njegova promotorska regija, jedne su od točaka u koje se integriraju različiti signalni putevi (slika 14.). Ova promotorska regija od > 2,8 kb jedna je od najvećih u kvaščevu genomu. Na promotorsku regiju *FLO11* vežu se transkripcijski faktori Ste12 i Tec1 koji su pod signalizacijom puta MAPK i transkripcijski faktor Flo8 (signalni put RAS/PKA), a ova dva signalna puta imaju aditivan učinak u pokretanju filamentacije (Rupp *et al.*, 1999, Chen i Thorner, 2010). Signalni put TOR uključen je vezanjem transkripcijskog faktora Gcn4 na promotorsku regiju *FLO11* (Braus *et al.*, 2003). Nadalje, ovdje se veže i transkripcijski represor Nrg1/2 čiju aktivnost regulira kinaza Snf1 i faktor Rim101 uključen u održavanje vrijednosti pH (Vyas *et al.*, 2003; Lamb i Mitchell, 2003). Ekspresiju gena *FLO11* reguliraju i male nekodirajuće RNA koje reguliraju proteini za preinaku kromatina, poput Rpd3 (Bumgarner *et al.*, 2009). Transkripcijski faktor Mss11 kojeg reguliraju putevi MAPK i PKA, također regulira transkripciju gena *FLO11* (van Dyk *et al.*, 2005).

## 1.6. Cilj istraživanja

Stanica u nepovoljnim uvjetima pokreće mehanizme obrane i prilagodbe, odnosno signalne puteve koji dovode do aktivacije ciljnih gena. Za pokretanje transkripcije potrebno je, među ostalim, djelovati na strukturu kromatina i učiniti gene dostupim transkripcijskom aparatu. Protein Taf14 iz obitelji proteina s domenom YEATS je podjedinica transkripcijskih faktora, kompleksa za preinaku kromatina i modifikaciju histona. Nedavno je opisana i uloga domene YEATS-Taf14 u prepoznavanju posttranslacijskih modifikacija histona poput krotonilacije, te je strukturno definiran mehanizam ovog prepoznavanja.

Cilj ovog istraživanja je dobivanje novih informacija o ulogama proteina s domenom YEATS, posebno proteina Taf14 kod kvasca. Pokušat ćemo rasvijetliti ulogu ovog faktora u održavanju integriteta stanične stijenke i u različitim vrstama filamentacije, odnosno morfoloških promjena koje se događaju u nepovoljnim uvjetima poput ograničenog izvora dušika ili ugljika. Molekularno-genetičke analize provest ćemo na kvascu *S. cerevisiae* koji godinama služi kao pouzdan i jednostavan model za proučavanje mehanizama eukariotskih stanica, a dobiveni rezultati primjenjivi su i za razumijevanje patogenih pripadnika ove porodice poput gljivice *C. albicans*.

Obzirom na ulogu proteina Taf14 u transkripciji, remodeliranju kromatina i posttranslacijskim modifikacijama, te ulogu domene YEATS u prepoznavanju acetilacije i krotonilacije, hipoteza ovog istraživanja je da protein Taf14 iz obitelji YEATS ima barem posrednu ili neposrednu ulogu u održavanju stanične stijenke i/ili filamentaciji kod kvasca *S. cerevisiae*, odnosno u odgovoru na stanični stres.

## **2. MATERIJALI I METODE**

## 2.1. Materijali

### 2.1.1. Kemikalije i reagensi

**Osnovne kemikalije:** agar (Fluka), agaroz (Sigma), aminokiseline (pojedinačne; Sigma), ampicilin (Sigma), amonijev sulfat  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (Kemika), amonijev acetat  $(\text{NH}_4\text{Ac}$ ; Kemika), aureobasidin (Takara), DMSO (Sigma), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Kemika), etanol (Kemika), fenol (Roth), fosfatna kiselina  $(\text{H}_3\text{PO}_4$ , Kemika), geneticin (G418, Sigma), D-glukoza (Sigma), glicerol (Difco), kalijev acetat (KAc; Kemika), kalijev klorid (KCl; Kemika), kanamicin (Sigma), kloridna kiselina (HCl; Kemika), kloroform (Kemika), limunska kiselina (Kemika), litijev acetat (LiAc; Sigma), litijev klorid (LiCl; Sigma), magnezijev klorid  $(\text{MgCl}_2$ ; Fluka), magnezijev sulfat  $(\text{MgSO}_4$ ; Sigma),  $\beta$ -merkaptioetanol (Sigma), mliječna kiselina (Kemika), natrijev acetat (NaAc; Kemika), natrijev citrat (Kemika), natrijev dihidrogenfosfat  $(\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Kemika), natrijev dodecilsulfat (SDS; Sigma), natrijev hidrogenfosfat  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Kemika), natrijev hidroksid (NaOH; Kemika), natrijev karbonat  $(\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Kemika), natrijev klorid (NaCl; Kemika), octena kiselina (Kemika), polietilenglikol 4000 (PEG4000; Sigma), Tris-(hidroksimetil)-aminometan (Tris; Sigma), Triton-X (Sigma).

**Enzimi, nukleotidi, DNA:** Taq-polimeraza s pripadajućim puferom (Applied Biosystems), Rnaza A (Fermentas), Proteinaza K (NEB), fosfataza CIAP (engl. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*; Invitrogen), restrikcijske endonukleaze HindIII, NdeI, XbaI, (New England Biolabs, Roche); DNA iz mliječi lososa ili haringe (Sigma), DNA faga  $\lambda$  (Fermentas), dNTP-ovi (100 mM, Sigma).

**Boje:** Crystal violet (Kemika), SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), SYTOX Orange Nucleic Acid Stain (Invitrogen), bromfenol modri (Kemika), ksilen cijanol (Roth), etidijev bromid (Sigma)

#### **Kompleti kemikalija:**

Komplet za pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom (PCR): QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen),

Komplet za pročišćavanje plazmidne DNA: QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen),

Komplet za izolaciju RNA: RNeasy Mini Kit (Qiagen),

Komplet za reverznu transkripciju: QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen),

Komplet kemikalija za qPCR: QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen).



### 2.1.2. Hranjive podloge i dodaci podlogama

Hranjive podloge pripremljene su s redestiliranom vodom i autoklavirane 15 minuta na temperaturi 121 °C i tlaku od  $1,01 \times 10^5$  Pa uz sporo spuštanje tlaka po završetku programa. Prikazani su recepti za tekuće podloge. Za krute podloge, osnovnom receptu se dodaje 20 g/L agara. Šećeri su autoklavirani posebno i dodani u osnovnu smjesu nakon hlađenja autoklavirane smjese (za tvrde podloge) ili prije korištenja (za tekuće podloge) kako bi se izbjegla karamelizacija smjese ili kontaminacija tekućih medija.

#### **Hranjive podloge za uzgoj bakterija**

Podloga LB (Luria/Bertani): 10 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 5 g/L kvašćevog ekstrakta. Hranjivoj podlozi LB dodaje se, ovisno o potrebnoj selekciji: geneticin (G418) 200 µg/mL, ampicilin 50 µg/mL; kanamicin 50 µg/mL. Antibiotici se dodaju nakon što se autoklavirani sastojci ohlade do ~ 60 °C.

Podloga SOC: 20 g/L triptona, 5 g/L ekstrakta kvasca, 3,6 g/L glukoze, 0,5 g/L NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>.

#### **Hranjive podloge za uzgoj kvasaca**

Podloga SC ili SD (engl. *synthetic complete*, *synthetic dropout*): 6,7 g/L izvora dušika bez aminokiselina (engl. YNB, *yeast nitrogen base w/o amino acids*), 20 g/L glukoze. Navedenim sastojcima nakon autoklaviranja dodaju se aminokiseline i uracil pripremljeni u 10X ili 100X koncentriranim radnim otopinama. Podloga koja sadrži sve dodatke naziva se SC (engl. *synthetic complete*), a po potrebi se (npr. za selekciju transformanata) neke aminokiseline izostave iz podloge pa govorimo o podlozi SD (engl. *synthetic dropout*).

Konačne koncentracije dodataka podlozi SC i drugim podlogama (kada je potrebno dodati određene aminokiseline) su kako slijedi: 40 mg/L adenil-sulfata, 20 mg/L arginil-klorida, 100 mg/L asparagina, 50 mg/L fenilalanina, 100 mg/L glutaminske kiseline, 20 mg/L histidil-klorida, 30 mg/L izoleucina, 100 mg/L leucina, 30 mg/L lizil-klorida, 200 mg/L



metionina, 3750 mg/L serina, 30 mg/L tirozina, 200 mg/L treonina, 40 mg/L triptofana, 150 mg/L valina, 20 mg/L uracila.

Podloga YPD: 10 g/L ekstrakta kvasca, 20 g/L peptona, 20 g/L D-glukoze.

Dodaci podlozi YPD za ispitivanje osjetljivosti sojeva (navedeni abecednim redom): 1 mM 4-NQO, 2 mg/mL bleomicin, 1 mg/mL Calcofluor White, 125 µg/mL caspofungin, 10 mg/mL Congo Red, DMSO, 500 µg/mL flukonazol, formamid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 M hidrokisurea, 0,1 M menadion, 10 % MMS, 5 M NaCl, 5 µM rapamicin. Navedene su koncentracije radnih otopina koje su sterilizirane preko filtera veličine pora 0,2 µm i dodane autoklaviranim sastojcima podloge ohlađenim na ~ 60 °C. Radne otopine su čuvane na + 4 °C ili - 20 °C. Iznimka je radna otopina Congo Red koja nije pogodna za filtriranje, pa je napravljena neposredno prije svakog korištenja. Otopine dodataka podlogama su pripremljene s vodom (izuzev rapamicina koji je topiv u DMSO, pa je napravljena dodatna kontrolna podloga za rapamicinske podloge s najvećim korištenim volumenom DMSO).

Podloga SLAD (engl. *Synthetic Low Ammonia Dextrose*): 1,7 g/L izvora dušika bez aminokiselina i amonijeva sulfata, 50 µM amonijeva sulfata (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 g/L glukoze uz dodatak nužnih aminokiselina za rast odabranih sojeva.

### 2.1.3. Organizmi i plazmidi

#### Bakterije

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : *F<sup>-</sup>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZAM15  $\Delta$  (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*),  $\lambda$ -).*

Bakterije soja DH5 $\alpha$  korištene su za čuvanje i umnožavanje plazmida u svrhu kloniranja.

#### Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Tablica 1. Sojevi kvasca *S. cerevisiae* korišteni u ovom istraživanju

Oznaka	Genotip	Pozadina/Izvor
YAT6	MAT alpha ura3-52 his3::hisG leu2::hisG	Sigma 1278-b; T. Reynolds
YAT7	MAT alpha flo11D::KANMX6	Sigma 1278-b; T. Reynolds
YAT36	MAT a ura3-52 his3::hisG leu2::hisG	Sigma 1278-b; T. Reynolds
YAT37	MAT a flo11D::KANMX6	Sigma 1278-b; T. Reynolds
YAT180	MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100	W303-1A; R. Rothstein
YAT297	BY4741 WT	BY4741
YAT554	taf14::KAN	BY4741 (iz YAT297)
YAT556	taf14::KAN	Sigma1278b (iz YAT6)
YAT557	taf14::KAN	Sigma1278b (iz YAT6)
YAT558	taf14::KAN	Sigma1278b (iz YAT6)
YAT559	taf14::KAN	Sigma1278b (iz YAT36)
YAT560	taf14::KAN	W303 (iz YAT180)
YAT561	taf14::KAN	W303 (iz YAT180)
YAT562	taf14::KAN	W303 (iz YAT180)
YAT570	Mat a/alpha	Sigma 1278b diploid
YAT571	Mat a/alpha	Sigma 1278b diploid
YAT572	Mat a/alpha	Sigma 1278b diploid
YAT573	Mat a/alpha	Sigma 1278b diploid
YAT577	Mat a/alpha ( <i>taf14<math>\Delta\Delta</math></i> )	Sigma 1278b diploid
YAT578	Mat a/alpha ( <i>taf14<math>\Delta\Delta</math></i> )	Sigma 1278b diploid
YAT579	Mat a/alpha ( <i>taf14<math>\Delta\Delta</math></i> )	Sigma 1278b diploid

Svi korišteni sojevi pohranjeni su u kolekciji sojeva laboratorija Instituta za biomedicinska istraživanja pod vodstvom dr. sc. Ane Traven. Izvorni sojevi divljeg tipa i mutanti *FLO11* u pozadini  $\Sigma$ 1278-b su poklon Todda Reynoldsa (Reynolds i Fink, 2001) i velikodušno su stavljeni na raspolaganje za ovaj rad, kao i mutant *TAF14* u pozadini BY4741 koji je dobiven iz kolekcije Marka Presscota. Ostali sojevi su konstruirani za ovaj rad kako je opisano u Metodama.

Kvaščevi sojevi su čuvani u otopini glicerola (15 %; steriliziranoj preko filtera veličine pora 0,2  $\mu$ m) na temperaturi -80 °C.

### Gljivica *Candida albicans*

Tablica 2. Sojevi *C. albicans* korišteni u ovom istraživanju

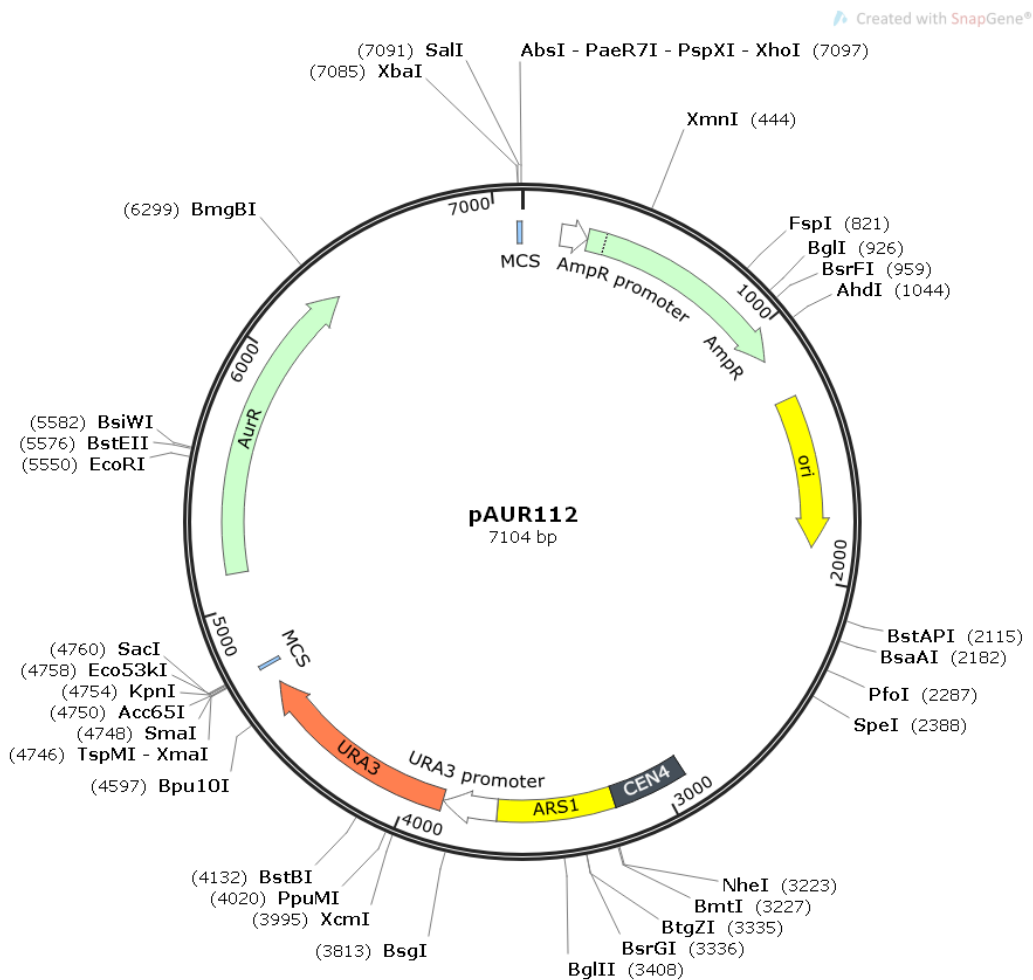
Oznaka	Genotip	Pozadina/izvor
YCAT638	leu2 $\Delta$ /leu2 $\Delta$ , arg4 $\Delta$ /arg4 $\Delta$ , his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ , ura3 $\Delta$ /URA3, iro1 $\Delta$ /IRO1	SN152 (S. Noble)
YCAT856	taf14::leu2/ <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT638)
YCAT857	taf14::leu2/ <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT638)
YCAT858	taf14::leu2/ <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT638)
YCAT859	taf14::leu2/taf14::his1	SN152 (iz YCAT856)
YCAT860	taf14::leu2/taf14::his1	SN152 (iz YCAT856)
YCAT861	taf14::leu2/taf14::his1	SN152 (iz YCAT857)
YCAT862	taf14::leu2/taf14::his1	SN152 (iz YCAT857)
YCAT863	taf14::leu2/taf14::his1	SN152 (iz YCAT858)
YCAT864	taf14::leu2/taf14::his1	SN152 (iz YCAT858)
YCAT871	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG- <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT859)
YCAT872	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG- <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT859)
YCAT873	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG- <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT859)
YCAT874	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG- <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT861)
YCAT875	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG- <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT861)
YCAT876	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG- <i>TAF14</i>	SN152 (iz YCAT861)
YCAT877	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG	SN152 (iz YCAT859)
YCAT878	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG	SN152 (iz YCAT859)
YCAT879	taf14::leu2/taf14::his1 SNARG	SN152 (iz YCAT861)

Sojevi *C. albicans* korišteni u ovom radu dio su kolekcije dr. sc. Ane Traven i korišteni su za vrijeme studijskog boravka na Sveučilištu Monash uz upoznavanje i poštivanje svih mjera opreza i sigurnosti u radu s patogenim organizmima. Izvorni soj SN152 poklon je Suzanne

Noble (Noble *et al.*, 2010), dok je ostale korištene sojeve *C. albicans* konstruirala Bella Wang (Wang *et al.*, 2020).

### Plazmid pAUR112 (Takara)

Centromerni plazmid pAUR112 korišten je kao vektor za unos divljeg tipa gena i točkastog mutanta u sojeve s deletiranim cijelim genom za testiranje komplementacije fenotipa pri izlaganju stresnim uvjetima. Za ugradnju upute za *TAF14* u plazmid korišteno je restrikcijsko mjesto za enzim XbaI.



Slika 15. Mapa plazmida pAUR112 korištenog za kloniranje konstrukata *TAF14*. Sekvence su ugrađene u mjesto rezanja enzima XbaI (u MCS, engl. *multiple cloning site*).

#### 2.1.4. Početnice

Oligonukleotidne početnice konstruirane su pomoću programa Primer3 i naručene od tvrtke IDT. Dobivene liofilizirane početnice su rehidrirane sterilnom vodom do koncentracije 100 µM, iz kojih su pripremljene radne otopine u koncentraciji 10 µM.

Početnice za konstrukciju sojeva kvasaca *S. cerevisiae* nabavljene su za vrijeme studijskog boravka na Sveučilištu Monash, a početnice za qPCR dobivene su ljubaznim posredstvom članova laboratorija dr. sc. Ane Traven na Institutu za biomedicinska istraživanja pri Sveučilištu Monash.

Tablica 3. Popis početnica korištenih za provjeru sojeva s delecijom *TAF14* i za umnažanje delecije metode PCR. Oznake prema smjeru i mjestu prijanjanja početnica u odnosu na gen: F engl. *forward*, R engl. *reverse*; US engl. *upstream*, DS engl. *downstream*, IN engl. *inside*. Sekvence su navedene u smjeru 5' - 3'.

Oznaka	Sekvenca
<hr/> <b>Provjera konstrukta</b> <hr/>	
scTAF14 F US100	GTATTACACGTCAAGGCTGTAGTGC
scTAF14 R DS100	GTGTCGCGGTTATTGGAATAAAGTT
scTAF14 F IN400	CGGAAAATACCACACGATTTGAACT
scTAF14 R IN200	CATTGACGAACAGGAAAATTCTCTA
scTAF14 R IN500	GCAAGTTCTTCTGTAAAAGTGGTT
Kan B	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT
Kan C	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
<hr/> <b>Umnažanje delecije metode</b> <hr/>	
scTAF14 F US200	AGCTTTCCTGTTTTATTTACTGTCA
scTAF14 R DS203	GGAATGTATATTTTGATGTTCTCA

Tablica 4. Popis početnica korištenih za qPCR za gene uključene u filamentaciju i održavanje stanične stijenke. Oznake: L engl. *left*, R engl. *right*. Sekvence su navedene u smjeru 5' - 3'.

Oznaka	Sekvenca
<b>Filamentacija</b>	
qPCR_SNF1_L	CTGTCCCAGTCACCTCCA ACTT
qPCR_SNF1_R	ACTTGCCATCCTTCTTGCGTGT
qPCR_FLO11_L	CCTTGTTCAACTGGTACTGGCGA
qPCR_FLO11_R	GGAGTTACTGGTGCACCTGGAGC
qPCR_FLO8_L	TGTTGCTGATGAAACCTCTGCAT
qPCR_FLO8_R	CCACATTGGATGAGGGCTGA
qPCR_TEC1_L	CGCCAATCACTGCTTCCAACG
qPCR_TEC1_R	GGAACGCACTTGTAGCCGTCT
qPCR_MSS11_L	CCAAGCGGAAACAGAGAGTGGG
qPCR_MSS11_R	ACCCTTACCGCCACTGTCT
qPCR_MFG1_L	CATTGACGCCGACAAGAAGG
qPCR_MFG1_R	TGGTGCGAGGAGAGATACCG
<b>Stanična stijenka</b>	
qPCR_CWP1_L	AGCTCTTCTGGTTTCTACGCTATCA
qPCR_CWP1_R	GATGAAGAGGAACTAGAGTCGCTTG
qPCR_KDX1_L	GTTTGAAAGCATACTACCTGGTGCT
qPCR_KDX1_R	CTAATTCCGCCATACTTTCGATATG
qPCR_HXK1_L	ACAAGACTGGTCACATTGCCGC
qPCR_HXK1_R	GCTTGCGTACCAGTCCATCC
qPCR_PRM5_L	GCCGCTATTCTCTCTTGATCCG
qPCR_PRM5_R	GCGACGATGCGGATGATGAAGA
qPCR_TDH1_L	GCTGCCGCTGAAGGTCCAAT
qPCR_TDH1_R	CGAAGATGGAAGCGTGAGTGCA
qPCR_FRE4_L	AACGACAGCAGAGAAGGCC
qPCR_FRE4_R	ACGACGGCAAGTGAACCAGA
qPCR_TIR1_L	TGCCAAGACCTCTGCCATCTCT
qPCR_TIR1_R	GCGACAACACCAGCACCCAT

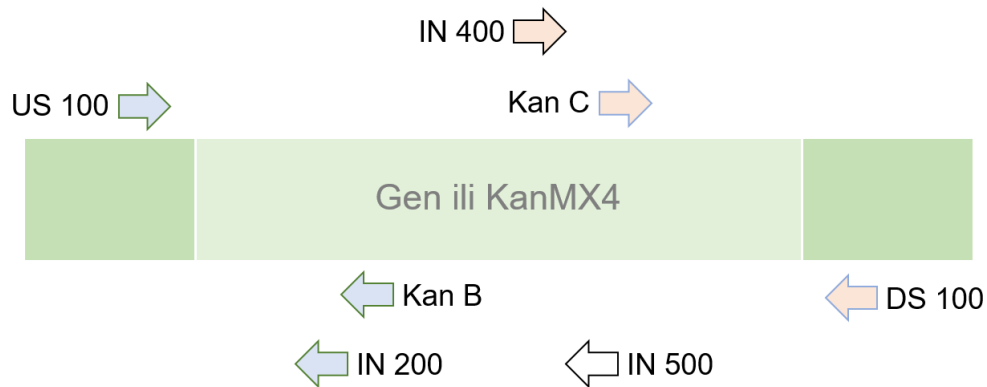
## 2.2. Metode

### 2.2.1. Konstrukcija sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

U ovom radu je korišteno više pozadinskih sojeva kvasca *S. cerevisiae* u kojima su konstruirani mutanti gena *TAF14*. Soj kvasca BY4741 *taf14::KanMX* ustupljen je od laboratorija prof. Marka Prescott a sa Sveučilišta Monash koji raspolaže kolekcijom delecijjskih sojeva (detalji o ovoj kolekciji sojeva *S. cerevisiae* dostupni su na web-stranici projekta [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/project\\_desc.html](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/project_desc.html)).

Sojevi preuzeti iz laboratorija M. Prescott a uzgojeni su na tvrdoj hranjivoj podlozi YPD, na 30 °C, dva dana. Pojedinačne kolonije su provjerene metodom lančanog umnažanja polimerazom (engl. *PCR, polimerase chain reaction*) i pohranjene.

Provjera PCR-om napravljena je korištenjem početnica koje prijanjaju uzvodno od ciljnog gena, nizvodno od gena te po dvije početnice unutar KanMX kazete i 3 početnice unutar gena *TAF14* (slika 16.; detaljan popis početnica nalazi se u Tablici 3.). Ovim pristupom potvrđena je i ugradnja kazete i odsutnost ciljnog gena. Reakcijska smjesa sastojala se od reakcijskog pufera i polimeraze Taq, 0,25 - 0,5 μM svake početnice, 200 μM smjese dNTP, kalupa DNA te vode do ukupnog volumena od 20 μL. Kao kalup je korištena genomska DNA ili je smjesi nastavkom za pipetu izravno dodano malo kolonije (količina koja bi odgovarala volumenu ~ 2 μL). Uz sve reakcijske smjese za PCR korištena je i NTC (engl. *no template control*) smjesa, a paralelno je testiran i izvorni divlji tip soja. Uvjeti reakcije PCR izravno iz kolonije su kako slijedi: početna denaturacija pri 94 °C, 3 min; 35 ciklusa ponavljanja koraka denaturacije pri 94 °C, 1 min; prijanjanja početnica pri 47 °C, 1 min i elongacije pri 72 °C, 2 min; te završnim korakom denaturacije pri 72 °C, 7 minuta i čuvanje do završetka eksperimenta na 4 °C. Reakcijske smjese su analizirane nakon gel elektroforeze (cijelom volumenu reakcijske smjese je dodano 4 μL 6x pufera za nanošenje s bojom; uvjeti: 1,0 % agarozni gel u puferu TAE uz dodatak boje za vizualizaciju DNA, 85 V, ~ 25 min) te je prema veličini dobivenih produkata potvrđena ugradnja KanMX kazete na mjestu gena *TAF14* u soju BY4741 *taf14Δ*.



Slika 16. Shematski prikaz strategije provjere zamjene ciljnog gena s delecijском kazetom KanMX4. Strelice simboliziraju aproksimativno mjesto prijanjanja početnica. Sve tri plavo odnosno ružičasto popunjene strelice su korištene u istoj reakcijskoj smjesi. U dodatnoj reakcijskoj smjesi je analiziran produkt početnica IN400 i IN500 (crni rub strelice) koji daje produkt veličine 100 pb samo ako u kalupu postoji divlji tip gena *TAF14*. Oznake uz početnice prema mjestu prijanjanja: IN - engl. *inside*, unutar gena; US - engl. *upstream*, uzvodno od gena; DS - engl. *downstream*, nizvodno od gena.

### Priprema konstrukta *taf14Δ* u ostalim pozadinskim sojevima

Prema soju dobivenom iz kolekcije prof. Prescottta napravljeni su mutanti s deletiranim genima u ostalim pozadinskim sojevima ( $\Sigma 1278$  MAT a,  $\Sigma 1278$  MAT  $\alpha$ , W3031a). Metodom PCR na genomskoj DNA izoliranoj iz soja BY4741 *taf14Δ* umnožena je delecijска kazeta na mjestu gena *TAF14* zajedno s 200 pb uzvodno i nizvodno od gena koja je potom transformirana u navedene divlje tipove. Transformacija je napravljena metodom s litijevim acetatom. Prekonoćna tekuća kultura kvasaca ujutro je razrijeđena do OD<sub>600</sub> 0,2 - 0,3 (20 mL kulture po transformacijskom setu) i uzgajana uz trešnju još 3 sata ili do bar jednog "udovostručenja" OD<sub>600</sub> vrijednosti. Stanice su istaložene i isprane sterilnom vodom (3000 rpm, 5 min) i talog je resuspendiran s 1 mL sterilne vode. Alikvotu stanica od 100  $\mu$ L dodano je redom 240  $\mu$ L 50 % PEG, 36  $\mu$ L 1M LiAC, 10 - 20  $\mu$ g DNA-nosača (DNA iz sperme haringe ili mliječi lososa, prethodno denaturirana pri 95 °C, 5 min i čuvana na ledu do korištenja) te DNA koju želimo transformirati (0,5 - 1  $\mu$ g). Smjesa je vorteksirana i inkubirana na 30 °C uz trešnju 30 min. Dodano je 40  $\mu$ L DMSO i smjesa je inkubirana na 42 °C, 12 - 15 min. Stanice su istaložene centrifugiranjem i resuspendirane u volumenu za nasađivanje na selekcijske hranjive podloge (100 - 200  $\mu$ L sterilne vode) ili u 10 mL tekućeg medija YPD i inkubirane na 30 °C još 3 sata. Posljednja dodatna trosatna inkubacija preporuča se kada se radi selekcija transformanata prema antibiotskoj rezistenciji, a izostavlja se kod selekcije prema auktotrofnim markerima



(sinteza aminokiselina). Dobiveni transformanti koji su rasli na selekcijskim pločama (ovdje genetin 200 µg/mL) provjereni su i potvrđeni metodom PCR izravno iz kolonija i sekvenciranjem.

Diploidni sojevi dobiveni su križanjem provjerenih konstrukata u pozadini Σ1278 MAT a i Σ1278 MAT α, a postojanje gena *MAT a* i *MAT α* provjereno je metodom PCR kako je ranije opisano.

Svim korištenim sojevima kvasca *S. cerevisiae* provjerena je sposobnost rasta na podlogama s glicerolom (YPG) kako bi se isključila mogućnost da se razvio *petit*-mutant (popratna mutacija gena *rho* koja dovodi do promjena metabolizma kvasca i može utjecati na rezultate testova).

### Priprema komplementacijskih sojeva

Sojevima kvasca *S. cerevisiae* s mutacijom *taf14Δ* vraćen je divlji tip gena *TAF14* na plazmidu zajedno s promotorskom regijom. Umnožena je regija 1000 pb uzvodno i nizvodno od gena *TAF14* i ugrađena u centromerni plazmid pAUR112 na restrikcijsko mjesto za enzim XbaI. Transformacijom metodom s LiAc (opisana gore) plazmid je unesen u mutant *taf14Δ* i selektiran na hranjivim pločama s 0,3 µg/mL aureobasidina A. Komplementacijski soj je korišten za testiranje vraćanja fenotipa divljeg tipa kod testiranja osjetljivosti i otpornosti na tvari koje dovode do staničnog stresa. Na istom plazmidnom konstrukt je napravljen i mutant *TAF14* W81A (u suradnji s dr. sc. Anom Šimatović) koristeći set za usmjerenu mutagenezu (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent). Kod za aminokiselinu triptofan (W) zamijenjen je kodom za aminokiselinu alanin (A) na proteinskoj poziciji 81 (slika 17.). Točnost zamjene nukleotida provjerena je sekvenciranjem.

```

TAF14    214  CCACCATTTAGAATTGAGGAACAAGGT TGG GGTGGATTTCCTT    256
          |||
P W81A    1   CCACCATTTAGAATTGAGGAACAAGGT GCG GGTGGATTTCCTT    43

```

Slika 17. Poravnanje sekvence divljeg tipa gena *TAF14* i jednog od korištenih primera za usmjerenu mutagenezu na plazmidu. Na poziciji 241-243 je umjesto slijeda TGG unešen slijed AGA, odnosno kod za triptofan je zamijenjen kodom za alanin (W81A) u sekvenci gena *TAF14*. Zamjena je provjerena sekvenciranjem konstrukta.

### 2.2.2. Ispitivanje rasta i otpornosti na toksične spojeve

Osnovni uvjeti za uzgoj kvasaca uključuju temperaturu od 30 °C, uz trešnju (180 - 200 rpm) za tekuće kulture. Imajući na umu da se u eksperimentima koristio bogati hranjivi medij za uzgoj, sve prekonoćne kulture su nasađene zajedno s reprezentativnim volumenom samog medija kako bi se pratilo je li došlo do zagađenja ili kontaminacije medija. Komplementacijski sojevi s plazmidom dobiveni selekcijom na aureobasidin A su i u tekućim kulturama uzgajani uz dodatak antibiotika.

Testiranje i uzgoj sojeva *C. albicans* napravljeno je na isti način kao za *S. cerevisiae*, osim što je osnovnoj podlozi YPD dodan i uridin (80 µg/mL) koji je potreban za rast ovih sojeva *C. albicans*.

Krivulja rasta tijekom 24 sata napravljena je na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan M200 Pro. Prekonoćne kulture ispitivanih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* razrijeđene su do OD<sub>600</sub> 0,1 te su alikvoti volumena 200 µL inokulirani u mikrotitarsku pločicu u triplikatima. Uređaj je programiran da održava temperaturu 30 °C uz orbitalnu trešnju s prekidima za mjerenje. Apsorbancija pri valnoj duljini 600 nm očitavana je svakih 30 minuta tijekom 24 sata.

### **Spot-testovi osjetljivosti**

Hranjive podloge za testiranje osjetljivosti kvašćevih sojeva pripravljene su kako slijedi. Autoklavirani medij YP s agarom je ohlađen do ~ 60 °C u vodenoj kupelji te je dodana glukoza. Prethodno je, ovisno o željenoj koncentraciji svake od ispitivanih tvari, prikladan volumen tvari dodan u Falcon-tubu ukupne zapremnine 50 mL. Tekući YPD s agarom je dodan do punog volumena od 50 mL, smjesa je izmješana laganim prevrtanjem i izlivena u standardne polistirenske okrugle posude za uzgoj (Petrijeve zdjelice ili "ploče"). Volumen od 50 mL dostatan je za pripremu dviju podloga. Za ispitivane tvari koje se ne otapaju u vodi, napravljen je i set podloga samo s otapalom u kojem je tvar pripravljena kako bi se isključio utjecaj odabranog otapala na rezultate testa. Radne otopine ispitivanih tvari su filter-sterilizirane gdje je prikladno. Volumen dodane ispitivane otopine prilagođen je kako bi se osiguralo učinkovito i jednakomjerno miješanje tvari i medija. Podloge su ostavljene na sušenju i polimerizaciji na sobnoj temperaturi do idućeg jutra kada su se koristile. Testirane su najmanje 3 različite koncentracije svake tvari kako bi se ustanovio efekt. U poglavlju Rezultati navedene su konačne

koncentracije ispitivanih tvari kod informativnih rezultata, a popis korištenih tvari s koncentracijama radnih otopina iznesen je u Materijalima.

Za ispitivanje utjecaja toksičnih tvari na odabrane sojeve, prekonocna kultura kvasca je ujutro razrijeđena do  $OD_{600}$  0,5 te su napravljena serijska razrijeđenja (10x) do  $10^{-4}$ . Izvorna suspenzija kvasca i serijska razrijeđenja su pripremljeni u mikrotitarskoj pločici, te nasadeni na hranjive podloge u volumenu od 2,5  $\mu$ L. Nasadeni kvasci su inkubirani na 30 °C (ili na odgovarajućoj temperaturi) i fotografirani nakon 2 i 3 dana od nasađivanja.

Testiranje rasta u prisutnosti flukonazola napravljeno je metodom diska. Na hranjivu podlogu YPD ispusti se 50  $\mu$ L kvasca ( $OD_{600}$  0,5) te se laganim pokretima vrhom staklenog štapića ili sterilnim dugim pamučnim štapićem ravnomjerno rasporedi suspenzija po podlozi. Na sredinu takve podloge se sterilnom pincetom postavi disk koji sadrži flukonazol (25  $\mu$ g) te se dokumentira veličina zone bez rasta oko diska nakon 24 i 48 sati inkubacije na 30 °C.

### **Analiza napredovanja kroz stanični ciklus protočnom citometrijom**

Analiza utjecaja tretmana CFW na oporavak odnosno napredovanje kroz stanični ciklus za sojeve divljeg tipa i *taf14Δ* u pozadini  $\Sigma$ 1278 mat a (YAT36 i YAT559) napravljeni su protočnom citometrijom.

Prekonocna kultura kvasca divljeg tipa i mutanta *taf14Δ* ujutro je razrijeđena i uzgajana do jednog udvostručenja  $OD_{600}$  (prosječno do  $OD_{600}$  0,5) kada je kulturi dodano 20  $\mu$ g/mL CFW. Nakon 2 sata tretmana, kultura je isprana od medija s CFW (ispiranjem sterilnom vodom i centrifugiranjem) te je pola početnog volumena kulture uzgajano u mediju YPD a pola i dalje uz prisutnost 20  $\mu$ g/mL CFW. Uzgoj je nastavljen još 6 sati. Uzorci za FACS uz očitavanje vrijednosti  $OD_{600}$  izdvojeni su prije i nakon prvog dvosatnog tretmana CFW, te nakon svakog sata tijekom šestosatnog uzoja u YPD i YPD + 20  $\mu$ g/mL CFW. Uzorci za FACS (500  $\mu$ L kulture,  $1,2 - 4,3 \times 10^6$  stanica, ovisno o fazi eksperimenta) fiksirani su dodavanjem 4,5 mL 96 % etanola, kratko vorteksirani te su do analize pohranjeni na -20 °C. Na dan provođenja analize na uređaju BD FACScalibur uzorci su istaloženi centrifugiranjem (5 min, 4000 rpm, +4 °C) te su talozi resuspendirani s 1 mL 50 mM Na-citrata (pH 7,2 reguliran limunskom kiselinom u granulama). U fazi razbijanja membrana, uzorci su tretirani ultrazvučnom

sonikacijom (s probom, 10 s, amp 60-70, output 6-7), čuvani na ledu, istaloženi centrifugiranjem i resuspendirani u 1 mL 50 mM Na-citrata s dodanom Rnazom A (0,25 mg na 1 ml Na-citrata). Nakon kratkog vorteksiranja, uzorci su inkubirani 1 sat na temperaturi 37 °C uz miješanje (600 rpm), potom je svakom uzorku dodano 500 µg proteinaze K te je nastavljena inkubacija na 50 °C uz miješanje, 1 sat. Nakon uklanjanja supernatanta, talozima je dodano po 400 µL 50 mM Na-citrata s dodanom bojom Sytox orange (0,2 µL na 1 mL Na-citrata) koja se veže za nukleinske kiseline stanica kojima su razorene membrane. Uzorci su prebačeni u tube za protočnu citometriju, vorteksirani i čuvani na ledu u mraku. Analiza na uređaju izvršena je unutar sat vremena od bojanja Sytoxom. Analizirano je 20 000 stanica. Analiza je napravljena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga s prof. dr. sc. Dorom Višnjić.

### 2.2.3. Filamentacija

Ispitivanje sposobnosti sojeva *S. cerevisiae* za invaziju (prodiranje) i prijanjanje na podlogu te stvaranje biofilma provedeno je na sojevima genetičke pozadine  $\Sigma$ 1278. Postupnici su prilagođeni prema Reynolds i Fink, 2001 i Cullen, 2015.

#### **Test formiranja "tepiha"**

Test formiranja "tepiha" (engl. *mat formation assay*) izvodi se na standardnim podlogama YPD s različitim udjelom agara. Testirani su haploidni sojevi na podlogama s 0,3 %, 2 % i 4 % agara. Prekonoćna kultura stanica kvasca razrijeđena je do OD<sub>600</sub> 0,5 te je 10 µL nacijepljeno na sredinu hranjive podloge. Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi bez okretanja na poklopac, promatrane i dokumentirane svaki drugi dan u periodu od 5. do 15. dana inkubacije. Uz divlji tip, korišten je i kontrolni soj *flo11Δ* koji nema sposobnost filamentacije i ne može stvarati "tepih" (negativna kontrola).

#### **Test prijanjanja u podlogu**

Sposobnost kvasaca da prodiru u krutu podlogu YPD testira se ispiranjem (engl. *plate wash assay*). Prekonoćna kultura haploidnih sojeva razrijeđena je do OD<sub>600</sub> 0,5 te je alikvot svakog soja (50 µL) nacijepljen na jednaku udaljenost od sredine i ruba podloge kako bi se sojevima koje uspoređujemo osigurao jednak pristup nutrijentima te isti uvjeti rasta i ispiranja. Podloge su inkubirane 13 dana na sobnoj temperaturi i dokumentirane. Potom su podloge isprane pod jednakim mlazom vode (ispiranje se zaustavlja kad se ispere negativna kontrola - soj *flo11Δ* koji nema sposobnost prodirati u podloge) te su dokumentirani rezultati. Nakon ispiranja vodom vrši se i test ispiranja uz trljanje podloge prstom u rukavicama (engl. *rub*) uz dokumentiranje.

## Test prijanjanja na polistiren

Analiza formiranja biofilma na plastici provodi se pomoću obilježavanja bojom Crystal violet te mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 570 nm. Prekonoćna kultura kvasaca razrijeđena je do OD<sub>600</sub> 1, te isprana od medija centrifugiranjem. Svaki soj resuspendiran je u mediju YPD s tri različite koncentracije glukoze (0,1 %, 1 % i 2 %) i 100 µL je nacijepljeno u mikrotitarsku pločicu koja je potom inkubirana na 30 °C. Jedan set analiziran je nakon 2 sata, a drugi, istovjetni, nakon 4 sata inkubacije. Svaki uzorak pripremljen je u triplikatu. Po isteku inkubacije, mikrotitarska pločica je prevrnutu uz trzaj kako bi se odstranile suspenzije kvasaca koji nisu formirali biofilm. Dodano je 100 µL 1 % boje Crystal violet koja je nakon 20 minuta isprana uranjanjem pločice u posudu s vodom. Dodano je 100 µL octene kiseline te je nakon pola sata izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 570 nm.

Određivanje vrijednosti CFU (engl. *colony forming units*) napravljeno je kod uzgoja kvasaca za analizu prijanjanja na polistiren i tretmana bojom Crystal violet. Izdvojeni su alikvoti kulture volumena 1 mL, očitana je vrijednost OD<sub>600</sub> te je poznati volumen nasađen na hranjivu podlogu YPD i inkubiran na 30 °C. Nakon 2 i 3 dana prebrojane su narasle kolonije.

## SLAD test

Za analizu rasta diploidnih sojeva na ograničenom izvoru dušika korištene su podloge SLAD. Prekonoćna kultura kvasaca ujutro je razrijeđena na OD<sub>600</sub> 1 te je 15 µL nasađeno na podlogu SLAD i jednakomjerno raspoređeno vrhom staklenog štapića. Podloge su inkubirane na 30 °C i promatrane tijekom 10 dana. Rezultati su dokumentirani pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX51 sa sustavom DP70 (digitalna kamera).

#### 2.2.4. Analiza ekspresije gena

Analiza ekspresije gena u različitim uvjetima napravljena je metodom sekvenciranja RNA (RNAseq). Fenotipske analize pokazale su neobičan fenotip kod *C. albicans* i *S. cerevisiae* pri izlaganju tvarima koje djeluju na integritet stanične stijenke. Kako bismo objasnili različit odgovor srodnih kvasaca na iste uvjete, napravljena je sveobuhvatna analiza ekspresije gena. Potrebno je što bolje odrediti uvjete uzgoja kvasaca pri tretmanu te je napravljeno više testova u kojima su kvasci izlagani različitim koncentracijama tvari u različitom trajanju. Odabrani su geni za koje je poznato da se aktiviraju pri stresu stanične stijenke te su analizirani qPCR-om nakon uzgoja. Također, analizirano je i preživljenje kvasaca (prebrojavanjem CFU) pri tretmanu kako bi se što više eliminirao utjecaj stanične smrti na rezultate. U ovom radu su prikazani rezultati za *S. cerevisiae*. Konačni ustanovljeni uvjeti uzgoja bili su kako slijedi: nakon udvostručavanja razrijeđene prekonoćne kulture, alikvot kulture izdvojen je kao uzorak bez tretmana, a ostatak je izložen tretmanu s 20 µg/mL Calcofluor White (CFW) te uzgajan dva sata. Uzorci su sakupljeni i izolirana je RNA (diploid soja  $\Sigma$ 1278 divlji tip i *taf14ΔΔ*, u duplikatu). Konačno sakupljanje kulture oba kvasca i izolaciju RNA obavila je Bella Wang. Grupa prof. Traude Beilharz sa Sveučilišta Monash napravila je sekvenciranje RNA, a članovi bioinformatičke grupe (Monash Bioinformatics Platform) obradili su rezultate RNAseq. Detalji obrade i filtriranja dobivenih podataka nalaze se u poglavlju Rezultati.

Relativna kvantitativna analiza ekspresije gena (qPCR) napravljena je za odabrane gene koji imaju ulogu u održavanju integriteta stanične stijenke prema literaturnim podacima i rezultatima analize RNAseq. Također, analiza ekspresije gena napravljena je i u uvjetima ograničenog izvora glukoze. Detalji uzgoja i pripreme za qPCR su kako slijedi.

Prekonoćna kultura kvasaca je razrijeđena do OD<sub>600</sub> 0,2 i uzgajana u standardnim uvjetima do OD<sub>600</sub> 0,8. Tada je izdvojen alikvot kulture koji je predstavljao početno stanje (točka 0). Preostala kultura je istaložena i resuspendirana u mediju YPD s dodatkom 20 µg/mL CFW te uzgajana dva sata nakon čega je uzet alikvot kulture (tretman). Alikvoti (20 mL) su istaloženi centrifugiranjem, isprani s 1 mL pufera TBS (pH 7,5), te su talozi pohranjeni na -80 °C do korištenja.

Izolacija RNA napravljena je prema postupniku proizvođača kompleta za izolaciju uz manje izmjene. Svakom talogu otopljenom na ledu dodano je 600 µL otopine za lizu RLT + β-merkaptoetanol (10 µL na 1 mL RLT). Nakon kratkog vorteksiranja, smjesa je prebačena u

tubice sa staklenim kuglicama (količina odgovara volumenu od ~ 200  $\mu$ L) te je napravljeno šest ciklusa vorteksiranja u trajanju od 1 min s pauzama na ledu 2 min. Smjesa iznad staklenih kuglica je izdvojena u novu tubicu, istaložena centrifugiranjem te je supernatant izdvojen za idući postupak. Dodano je 350  $\mu$ L 70 % etanola uz miješanje pipetiranjem te je cijeli volumen nanešen na RNeasy kolonicu. Kolona je isprana prema postupniku puferima RW1 jednom pa puferom RPE dva puta. Izolirana RNA je eluirana s membrane kolonice u 50  $\mu$ L vode bez RNaza te je koncentracija i kvaliteta izolata analizirana na uređaju NanoDrop. Izolat je čuvan na -20 °C do iduće obrade.

Reverzna transkripcija i uklanjanje genomske DNA napravljeni su prema uputama proizvođača kompleta kemikalija. Uklanjanje genomske DNA provedeno je na 1  $\mu$ g izolata uz 2  $\mu$ L pufera gDNA Wipeout i dodatak vode do ukupnog volumena 14  $\mu$ L. Smjesa je inkubirana 7 minuta na 42 °C. Za reverznu transkripciju je cijeloj smjesi (14  $\mu$ L) dodano 20  $\mu$ L reakcijske smjese za reverznu transkripciju (1  $\mu$ L RT Primer MIX, 1  $\mu$ L Quantiscript Reverse Transcriptase i 4  $\mu$ L 5x reakcijski pufer) te je sve inkubirano na 42 °C, pola sata. Reverzna transkripcija je zaustavljena inkubacijom na 95 °C, 3 min nakon čega su uzorci stavljeni na led ili pohranjeni na -20 °C do korištenja.

Reakcijska smjesa za qPCR ukupnog volumena 25  $\mu$ L sastojala se od 12,5  $\mu$ L 2x SYBR Mix, po 0,75  $\mu$ L 10  $\mu$ M početnica, 5  $\mu$ L cDNA (20x razrijeđen produkt reverzne transkripcije) i 6  $\mu$ L vode. Postavke reakcije su bile kako slijedi: početna denaturacija 15 min pri 95 °C, 40 ciklusa: denaturacije 15 s pri 94 °C, prijanjanja početnica 30 s pri 60 °C i elongacije 30 s na 72 °C. Nakon toga dodana je analiza krivulje "otapanja" (engl. *melting curve stage*; 15 s 95 °C, 1 min 60 °C, 15 s 95 °C, 15 s 60 °C). Korišten je uređaj Applied Biosystems 7300 Real Time PCR, a dobiveni podaci analizirani su metodama  $\Delta$ Ct ili  $\Delta\Delta$ Ct (navedeno u Rezultatima) te prikazani kao FC (engl. *fold change*). Obzirom na unaprijed isplaniranu raspodjelu financijskih sredstava iz projekta koji je završio rano tijekom izrade ovog rada, qPCR eksperimenti su napravljeni u malom broju ponavljanja stoga nije bilo primjereno raditi detaljniju statističku obradu.

Na isti način napravljena je i qPCR analiza ekspresije gena za sojeve u uvjetima s ograničenom glukozom. Ovdje je kao tretman korišten medij YP s 0,1 % glukoze (umjesto standardnih 2 %) i trajanje tretmana je 90 minuta. Uzgoj, izolacija RNA i svi postupci napravljeni su kako je opisano ranije za tretman CFW.



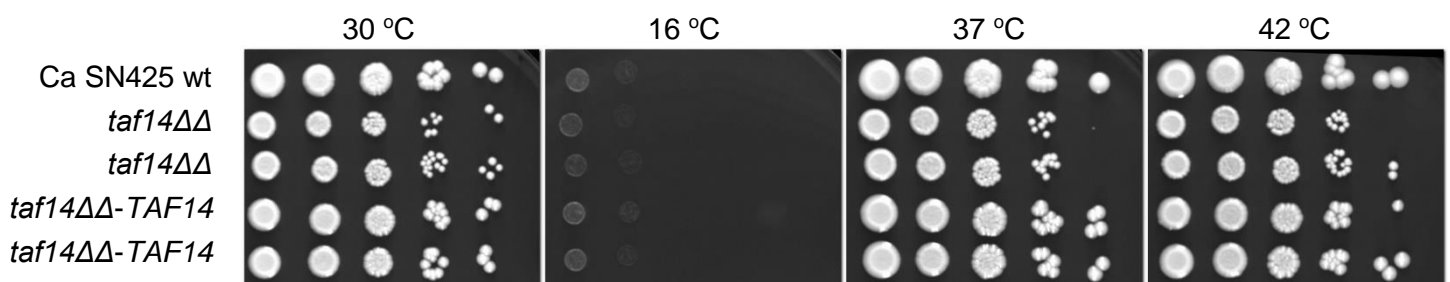
### **3. REZULTATI**

### 3.1. Fenotipska karakterizacija mutanta *TAF14*

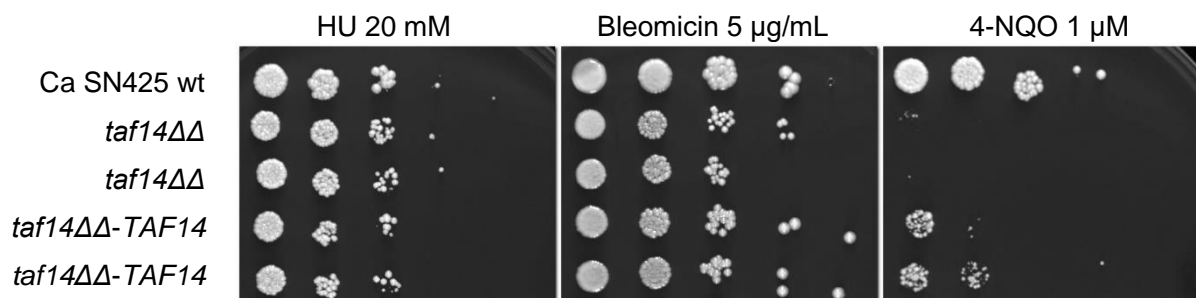
#### 3.1.1. Fenotipska karakterizacija sojeva *C. albicans*

Obzirom da je ovaj rad dio projekta na kojem se proučavao protein Taf14 kod *S. cerevisiae* i patogena *C. albicans*, početnim fenotipskim testovima podvrgnute su obje gljivice. Korištene sojeve gljivice *C. albicans* konstruirala je Bella Qi Wang u laboratoriju Instituta za biomedicinska istraživanja Sveučilišta Monash. U ovom radu se nakon inicijalnih istraživanja na obje gljivice, nastavlja s istraživanjem na kvascu *S. cerevisiae*. Prikazani su rezultati testova za *C. albicans* provedeni tijekom studijskog boravka na Sveučilištu Monash.

Gljivica *C. albicans* testirana je na rast pri različitim temperaturama i prisutnosti tvari za koje je poznato da dovode do staničnog stresa. Promatran je divlji tip (SN425), heterozigotni deletant *taf14Δ-TAF14*, homozigotni deletant *taf14ΔΔ*, homozigot *taf14ΔΔ-TAF14* kojem je plazmidom komplementirana jedna kopija gena *TAF14* te homozigot *taf14ΔΔ* kojem je ugrađen samo "prazni" plazmid korišten za komplementaciju.

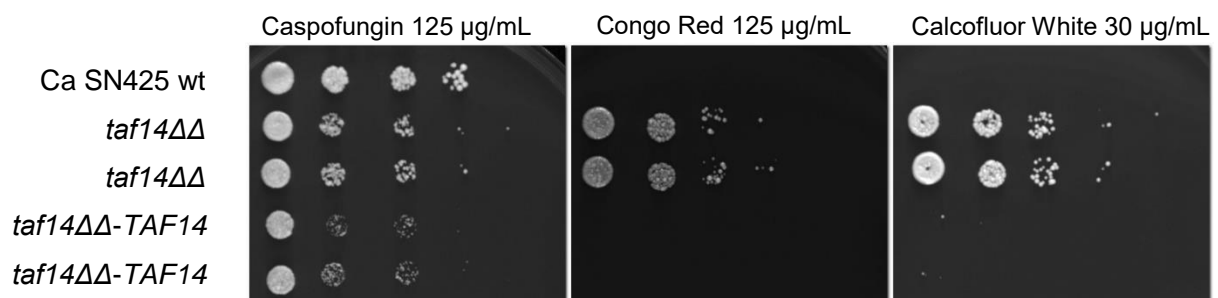


Slika 18. Rezultati rasta gljivice *C. albicans* na podlogama YPD nakon tri dana inkubacije na naznačenim temperaturama. Prikazani su reprezentativni rezultati eksperimenta koji je ponovljen najmanje tri puta u istim uvjetima.



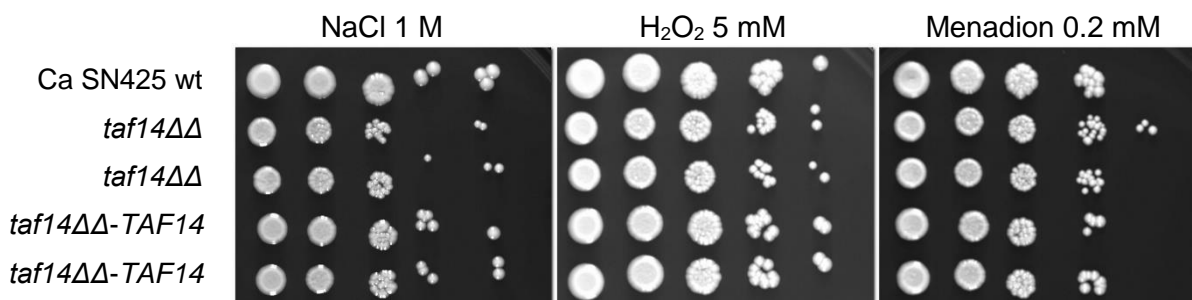
Slika 19. Rezultati rasta gljivice *C. albicans* u prisutnosti tvari koje dovode do oštećenja DNA. Prikazani su reprezentativni rezultati eksperimenta koji je ponovljen najmanje tri puta u istim uvjetima.

Testiranje rasta sojeva *C. albicans* pri različitim temperaturama pokazuje tek jako usporen rast pri temperaturi 16 °C, bez razlike među sojevima (slika 18.). Nadalje, pri izlaganju tvarima koje dovode do oštećenja DNA - hidroksiurei (HU), bleomicinu i derivatu kvinolina (4-NQO), ističe se izostanak rasta homozigotnog mutanta *taf14ΔΔ* na podlozi s 4-NQO (slika 19.). Testiranje osjetljivosti i rezistencije na tvari koje dovode do stresa stanične stijenke provedeno je u prisutnosti tvari Caspofungin, Congo Red i Calcofluor White (slika 20.). Caspofungin nije bitno utjecao na rast sojeva *C. albicans*, dok je izlaganje tvarima Congo Red i Calcofluor White dalo istovjetne rezultate i pokazalo izostanak rasta divljeg tipa i komplementacijskog soja te rezistenciju mutanta *taf14ΔΔ*.

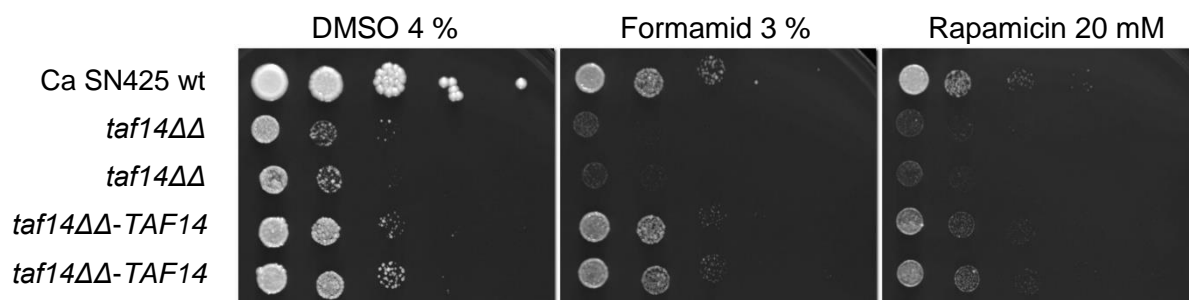


Slika 20. Rezultati rasta sojeva *C. albicans* u prisutnosti tvari koje dovode do stresa stanične stijenke. Prikazani su reprezentativni rezultati eksperimenta koji je ponovljen najmanje tri puta u istim uvjetima.

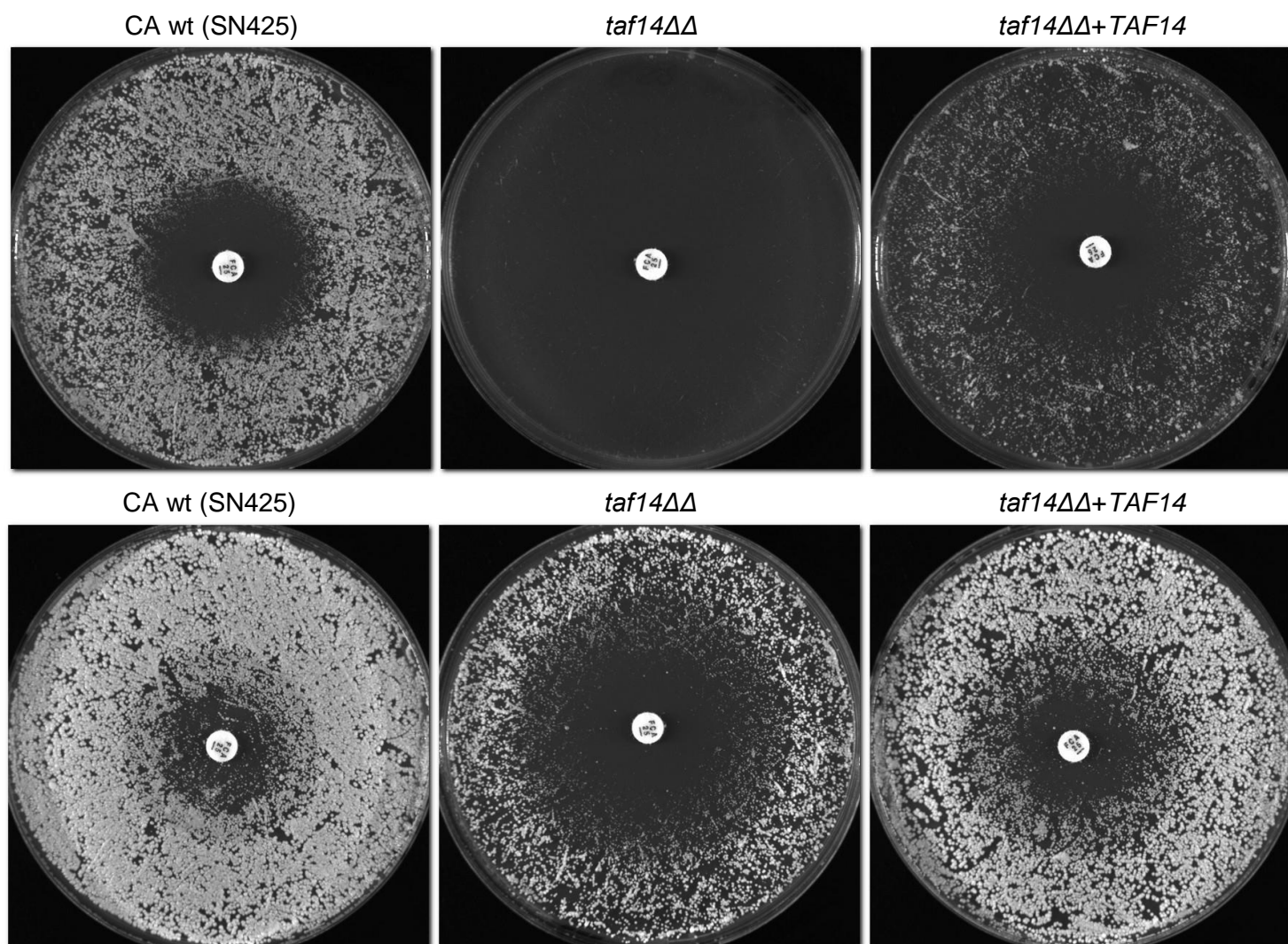
Osmotski stres i oksidativni stres postignuti su dodavanjem NaCl, odnosno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i menadiona u hranjive podloge. U navedenim uvjetima svi testirani sojevi su pokazali jednak rast (slika 21.). Tvari koje djeluju na stanične membrane i signalizaciju (DMSO i formamid; rapamicin) pokazale su blagu osjetljivost soja *taf14ΔΔ* u usporedbi s divljim tipom i komplementacijskim sojem (slika 22.). Testiranje stresa stanične membrane provedeno je i pomoću diskova koji sadrže flukonazol (slika 23.). Ovdje se ističe izostanak rasta mutanta *taf14ΔΔ* nakon 24 sata inkubacije i veća zona bez rasta oko diska nakon 48 sati.



Slika 21. Rezultati rasta gljivice *C. albicans* u prisutnosti tvari koje dovode do osmotskog (NaCl) i oksidativnog stresa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i menadion). Prikazani su reprezentativni rezultati eksperimenta koji je ponovljen najmanje tri puta u istim uvjetima.



Slika 22. Rast *C. albicans* u prisutnosti tvari koje djeluju na stanične membrane (DMSO i formamid) i signalizaciju (rapamicin). Prikazani su reprezentativni rezultati eksperimenta koji je ponovljen najmanje tri puta u istim uvjetima.

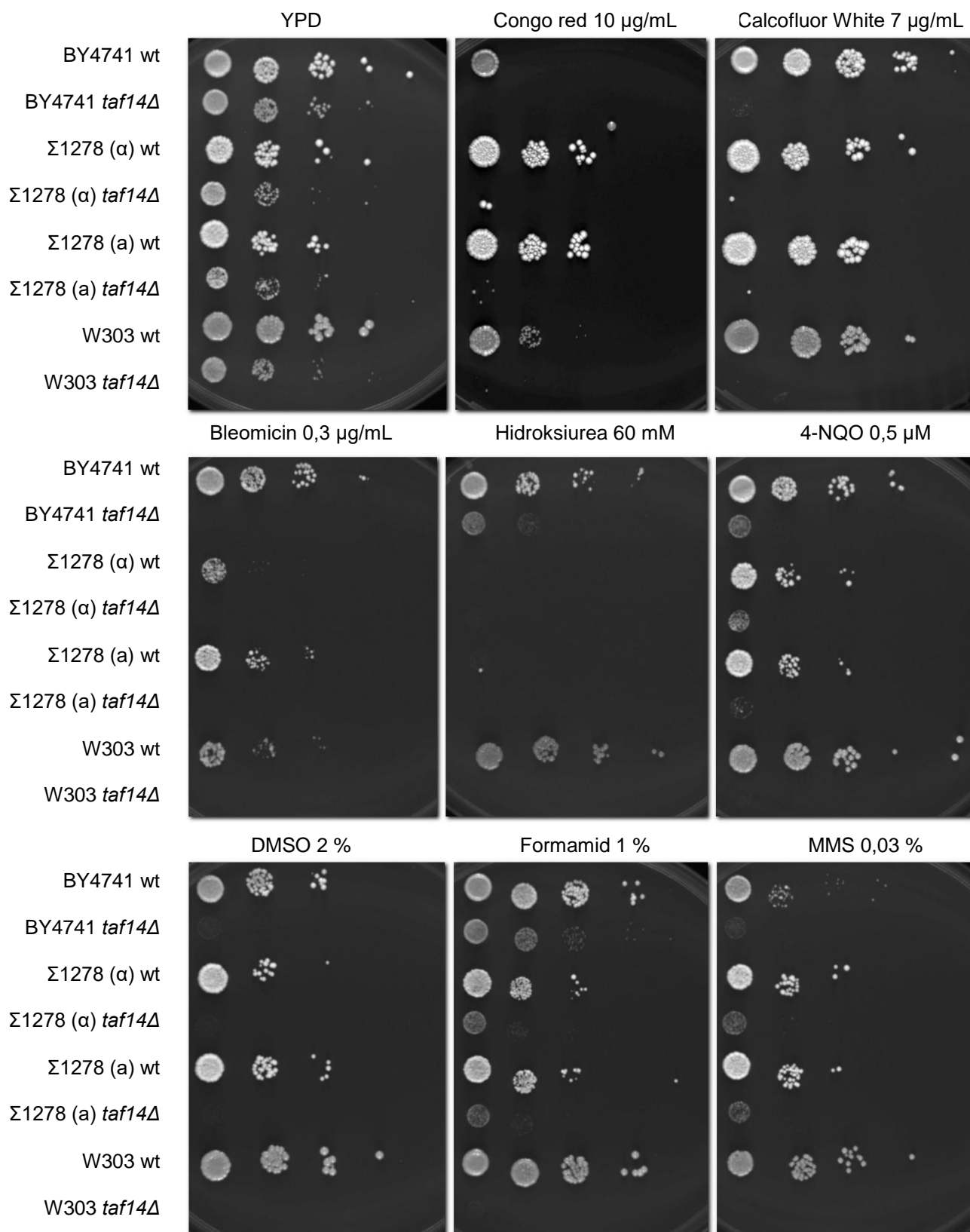


Slika 23. Rezultat testa osjetljivosti sojeva na flukonazol za sojeve *Candida albicans*. Uspoređeni su divlji tip, *taf14ΔΔ* i soj s komplementiranim *taf14ΔΔ+TAF14*. Gornji red prikazuje rezultat nakon 24 sata, a donji red prikazuje rezultate istog seta nakon 48 sati od nasađivanja. Istovjetni eksperiment ponovljen je najmanje tri puta.

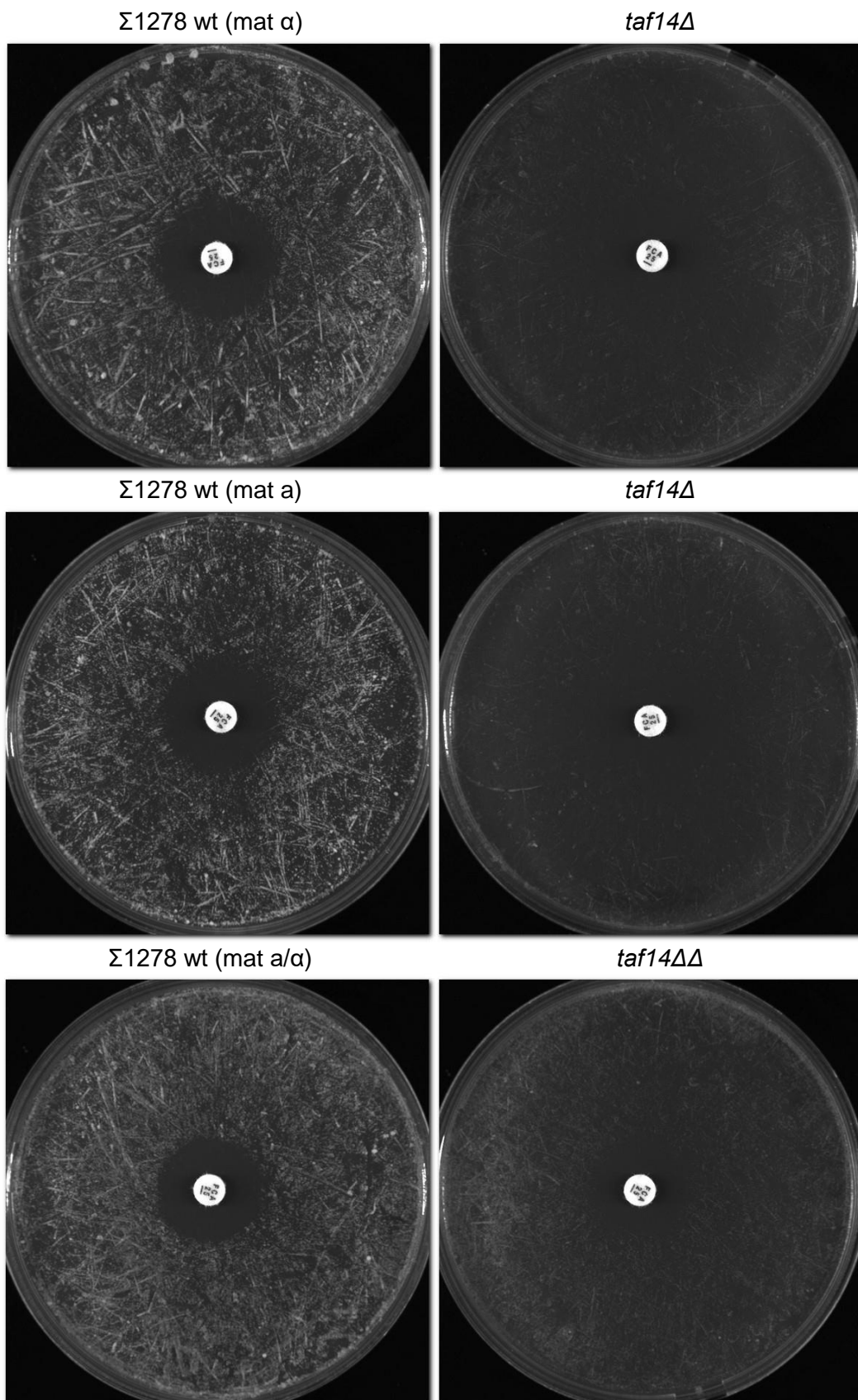
### 3.1.2. Fenotipska karakterizacija sojeva *S. cerevisiae*

Analize rasta sojeva *S. cerevisiae* provedene su u tri različite genetičke pozadine (BY4741,  $\Sigma$ 1278 i W303). Različiti divlji tipovi odnosno pozadinski sojevi koriste se u različitim istraživanjima. Na primjer, sojevi pozadine  $\Sigma$ 1278 pogodni su za testiranje filamentacije, dok se u istraživanjima oštećenja DNA najčešće koriste pozadine W303 i BY4741. Također, postoji mogućnost da genetička pozadina korištenog "divljeg tipa" nakon unesene mutacije utječe na konačan fenotip koji pripisujemo mutantu. Slijedom svega navedenog, u inicijalnim testiranjima je korišteno više genetičkih pozadina u koje su istim postupcima (opisanim u poglavlju Metode) uvedene mutacije gena *TAF14*.

Analiza rasta mutanta *taf14Δ* u različitim pozadinama (slika 24.) pokazuje da je ovaj mutant osjetljiv na tvari koje utječu na oštećenje DNA (bleomicin, hidroksiurea, 4-NQO i MMS) i to je najjasnije kod sojeva u pozadini W303 koji se najčešće i koristi u ovom kontekstu. Tvari koje dovode do narušavanja integriteta stanične stijenke (Calcofluor White i Congo Red) dovele su do izostanka rasta mutanta *taf14Δ* u svim pozadinskim sojevima. Stres stanične membrane tvarima DMSO i formamid rezultirao je potpunim izostankom rasta mutanta *taf14Δ* u svim pozadinama kod izlaganja DMSO te u pozadini W303 kod izlaganja formamidu. Testiranje rasta u prisutnosti flukonazola na disku pokazuje da nema razlike između divljeg tipa i konstrukata *taf14Δ* u veličini zone bez rasta nakon 48 sati (slika 26.), a nakon 24 sata se vidi sporiji rast *taf14Δ* (slika 25.).

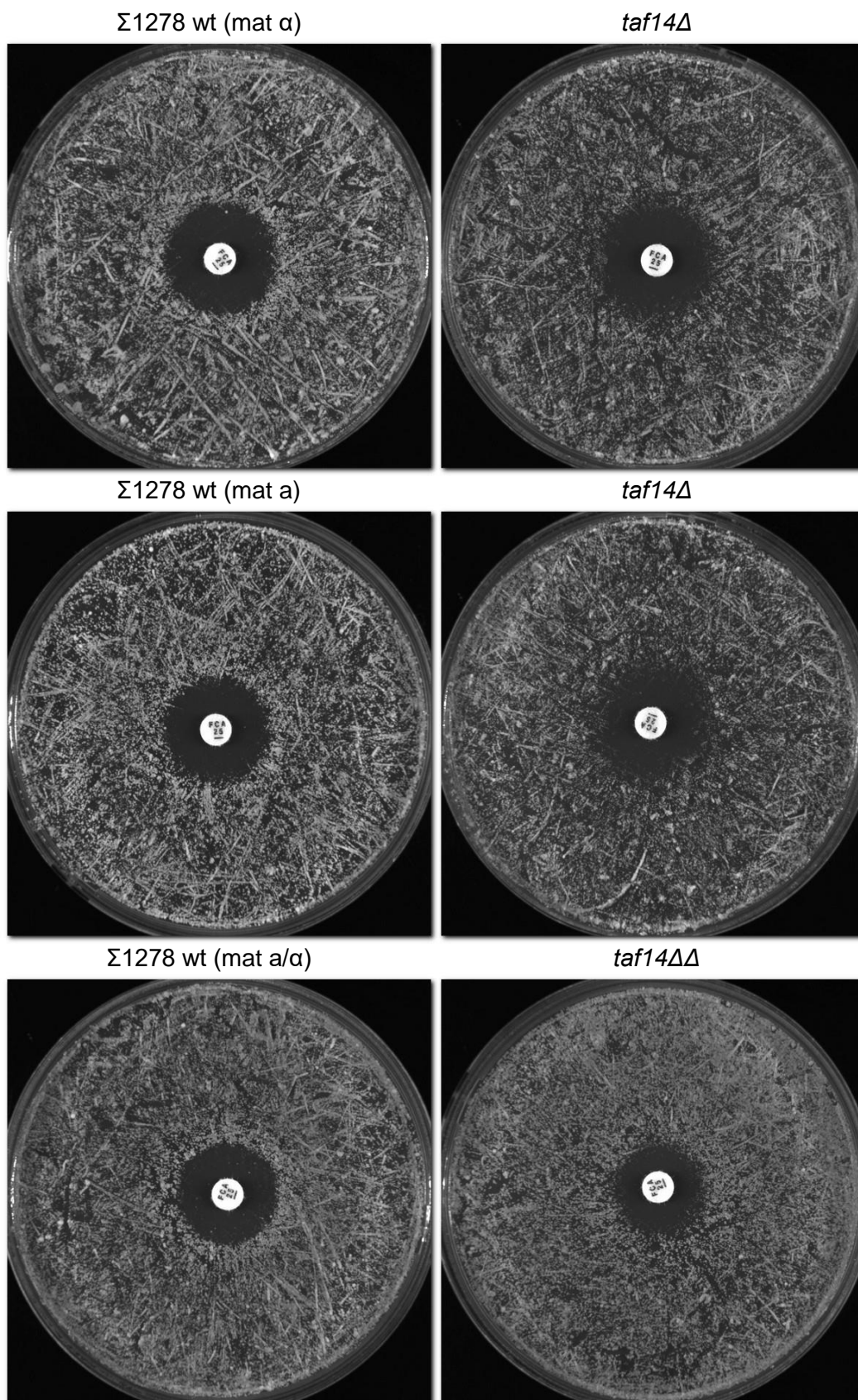


Slika 24. Rezultati rasta mutanta *taf14Δ* kod kvasca *S. cerevisiae* pri izlaganju tvarima koje djeluju na staničnu stijenku, membrane i DNA. Prikazani su reprezentativni rezultati eksperimenta koji je ponovljen najmanje tri puta u istim uvjetima.



Slika 25. Rezultat testa osjetljivosti sojeva na flukonazol. Uspoređeni su divlji tip i *taf14Δ* u tri različite pozadine (haploidi Σ1278 mat a i α, te diploid mat a/α). Lijeva slika prikazuje divlji tip, a desna prikazuje *taf14Δ* u pozadini naznačenoj lijevo. Slika prikazuje rezultate nakon 24 sata od nasađivanja.





Slika 26. Rezultat testa osjetljivosti sojeva na flukonazol. Uspoređeni su divlji tip i *taf14Δ* u tri različite pozadine (haploidi  $\Sigma 1278$  mat a i  $\alpha$ , te diploid mat a/ $\alpha$ ). Lijeve slike prikazuju divlji tip, a desne prikazuju *taf14Δ* u pozadini naznačenoj lijevo. Slike prikazuju rezultate nakon 48 sati od nasađivanja.



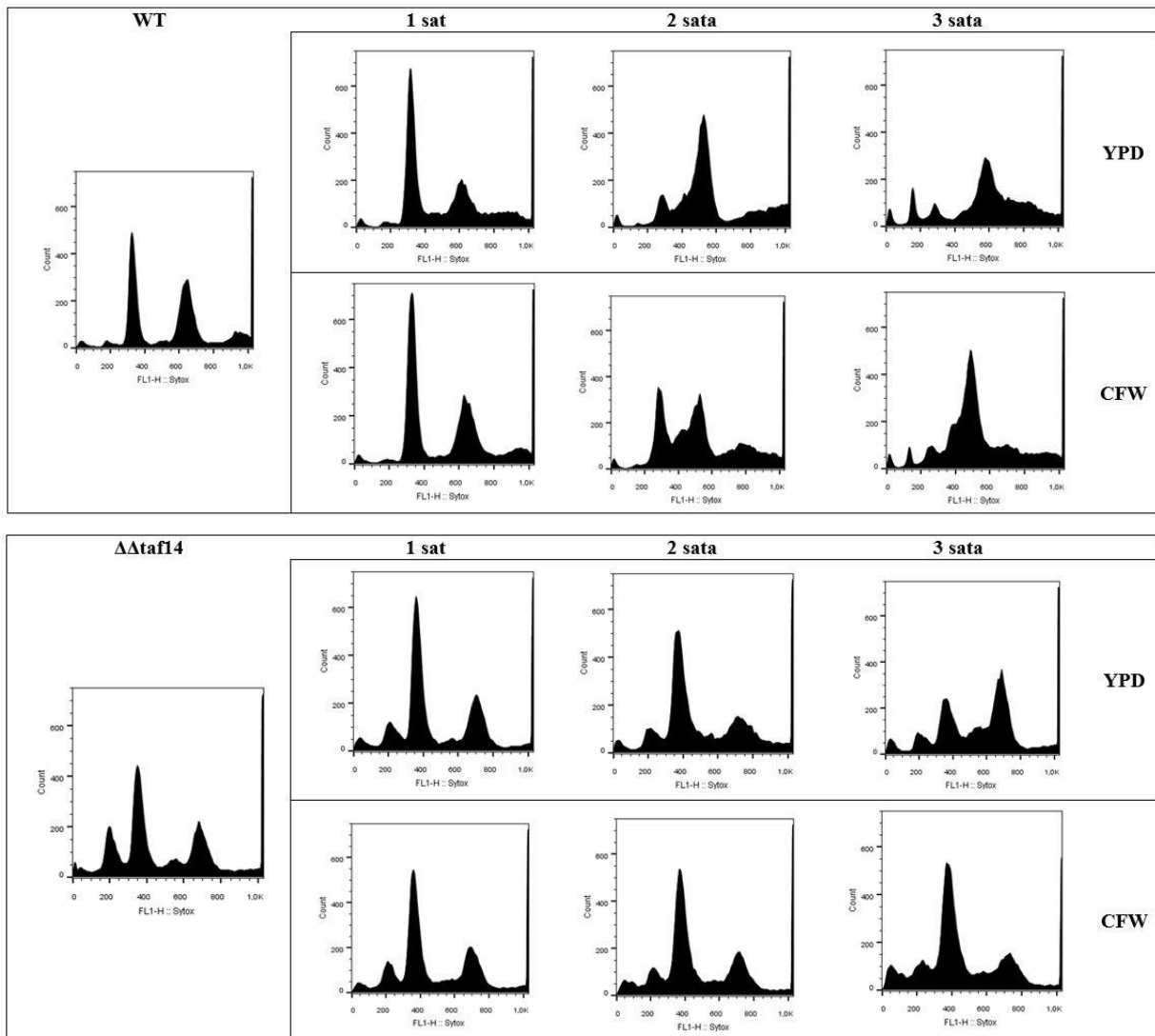
## 3.2. Utjecaj mutacije *TAF14* na očuvanje integriteta stanične stijenke

Nakon početnih analiza osjetljivosti pri izlaganju različitim vrstama staničnog stresa, posebno su se izdvojile pojedine fenotipske karakteristike sojeva *S. cerevisiae* i *C. albicans* pri izlaganju stresu stanične stijenke. Kako je opisano, kod gljivice *C. albicans*, kad su sojevi uzgajani na podlogama s tvarima Calcofluor White i Congo Red, divlji tip i komplementacijski soj ne rastu, dok mutant *taf14ΔΔ* pokazuje rezistenciju. Suprotno tome, kod kvasca *S. cerevisiae*, izlaganje istim tvarima koje djeluju na staničnu stijenku pokazuje normalan rast divljeg tipa i osjetljivost (potpuni izostanak rasta) kod mutanta *taf14Δ*. Ovi rezultati usmjerili su naša iduća istraživanja na analize moguće uloge i utjecaja proteina Taf14 na očuvanje integriteta stanične stijenke.

U ovom dijelu istraživanja je korišten diploidni soj kvasca *S. cerevisiae* kako bismo kasnije, po potrebi mogli napraviti što precizniju usporedbu s diploidnom gljivicom *C. albicans* na kojoj su istraživanja proveli suradnici sa Sveučilišta Monash. Također, korišten je i konstrukt s točkastom mutacijom W81A, na poziciji za koju je pokazano da je važna za interakciju s histonima.

### 3.2.1. Rast i stanični ciklus pri izlaganju CFW

Za analizu napredovanja kroz stanični ciklus korištena je metoda protočne citometrije nakon označavanja nukleinskih kiselina bojom Sytox. Kako je opisano, nakon dvosatnog izlaganja tvari Calcofluor White koja djeluje na stanične stijenke vezanjem na strukturne  $\beta$ -1,3-glukane, dio kulture uzgajan je u standardnim uvjetima, a dio je i dalje uzgajan u prisutnosti CFW. Kultura divljeg tipa očekivano se oporavlja nakon stresa stanične stijenke i u standardnom mediju pokazuje progresiju kroz stanični ciklus (nakon 1 sata vidljiv je šiljak koji odgovara fazi G1, a nakon 2 sata šiljak kod G2/M). Divlji tip u daljnjem uzgoju uz CFW pokazuje nešto sporiji napredak kroz ciklus pa vidimo G1 šiljak nakon jednog sata, prijelazni oblik nakon 2 sata i G2 nakon 3 sata rasta. Mutant *taf14ΔΔ* bitno zaostaje u napredovanju kroz ciklus u standardnim uvjetima nakon stresa stanične stijenke pa tek nakon 3 sata vidimo blagi pomak iz G1 faze. U prisutnosti CFW, mutant *taf14ΔΔ* ne pokazuje napredak kroz ciklus ni nakon 3 sata (slika 27.), a u daljnjem uzgoju je vidljivo nakupljanje agregata.



Slika 27. Rezultati analize FACS nakon uzgoja sojeva *S. cerevisiae* divljeg tipa i *taf14ΔΔ*. Oba soja su prvo uzgajana 2 sata uz CFW 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , potom je dio svake kulture uzgajan u mediju YPD a dio uz prisutnost CFW još 6 sati. Prikazani su reprezentativni rezultati za prva 3 sata dodatnog uzgoja odnosno oporavka.

### 3.2.2. Analiza ekspresije gena u uvjetima stresa stanične stijenke

Kao što je već spomenuto, fenotipske analize osjetljivosti i otpornosti na tvari koje dovode do stresa stanične stijenke pokazale su oprečne rezultate kod dva ispitivana kvasca, stoga je napravljena analiza ekspresijskog profila metodom RNAseq. Testiranje uvjeta uzgoja (provjera preživljenja nakon ispitivanih doza metodom prebrojavanja CFU i qPCR za relevantne gene) napravljeni su za vrijeme studijskog boravka na Sveučilištu Monash, a konačni uzgoj sojeva (oba kvasca) i izdvajanje RNA za sekvenciranje napravila je Bella Qi Wang. Sekvenciranje RNA napravila je grupa Traude Beilharz, a grupa za bioinformatičku analizu sa Sveučilišta Monash je obradila rezultate. U ovom radu, komentirat ćemo rezultate analize RNAseq za kvasac *S. cerevisiae* (detalji o uvjetima, uzgoju i pripremi opisani su u poglavlju Metode).

Nakon bioinformatičke obrade, usporedne rezultate analize RNAseq smo preuzeli s platforme Degust za promatranje diferencijalne ekspresije gena te analizirali promjene i ulogu proteina Taf14 na ekspresijski profil kvasca. Podatke smo filtrirali prema parametrima  $\log_2 FC$  (engl. *fold change*) i FDR (engl. *false discovery rate*) te su oni postavljeni na  $\log_2 FC = 1$ ,  $FDR \leq 0,01$ . Parametar  $\log_2 FC = 1$  odgovara 2x povećanoj/smanjenoj ekspresiji pa smo ovako promatrali gene čije je ekspresija u promatranom paru uzoraka bar dva puta veća odnosno manja.

Provjerili smo koliko gena i kojim intenzitetom odgovara na uvjete uzgoja (tablica 5.). Promatrali smo usporedbu divljeg tipa i mutanta *taf14ΔΔ* u standardnim uvjetima (prvi stupac u tablici 5.), i usporedbu divljeg tipa i mutanta *taf14ΔΔ* pri tretmanu (zadnji stupac), te utjecaj tretmana CFW na divlji tip (drugi stupac) i mutant (treći stupac). U tablicama 12. - 15. prikazana je lista po 25 gena s najvećom i najmanjom diferencijalnom ekspresijom u promatranim parovima uzoraka nakon analize RNAseq.

Kako bismo bolje razumjeli što za stanicu znači izostanak *TAF14* i koja je njegova uloga pri izlaganju stresu stanične stijenke, dobiveni rezultati podvrgnuti su analizama prema GO (engl. *Gene Ontology*) pojmovima (po biološkom procesu, funkciji i lokalizaciji u stanici), KEGG te drugim dostupnim bazama na platformi STRING (Szklarczyk *et al.*, 2019; Szklarczyk *et al.*, 2021). Platforma STRING služi za analizu, tumačenje i vizualiziranje *omics*-podataka. Riječ je o alatu koji objedinjavanjem više dostupnih baza podataka omogućava njihovo istovremeno pretraživanje i analizu, a razvijena je od stručnjaka iz Švicarskog instituta za bioinformatiku, Centra za istraživanje proteina (Novo Nordisk Foundation) i Europskog laboratorija za molekularnu biologiju (EMBL) koji su okupljeni u konzorcij STRING.

Tablica 5. Analiza rezultata RNA-seq. Prikazan je ukupan broj eksprimiranih gena za svaku od četiri usporedbe, te po kategorijama raspona  $\log_2$  FC. Rezultati se odnose na broj gena nakon primjene filtera  $\log_2$  FC = 1 i FDR  $\leq$  0,01. Kratice: nt (engl. *no treatment*, bez tretmana); CFW (Calcofluor White); WT (engl. *wild type*, divlji tip); MUT (engl. *mutant*; mutant *taf14ΔΔ*).

raspon $\log_2$ FC	WT_nt vs. MUT_nt	WT_nt vs. WT_CFW	MUT_nt vs. MUT_CFW	WT_CFW vs. MUT_CFW
$\geq 4$	14	42	6	2
<b>3 - 3.99</b>	32	69	19	6
<b>2 - 2.99</b>	70	166	63	33
<b>1 - 1.99</b>	174	499	312	162
<b>Ukupno ↑</b>	<b>290</b>	<b>776</b>	<b>400</b>	<b>203</b>
<b>-1 - -1.99</b>	90	596	470	140
<b>-2 - -2.99</b>	27	136	29	18
<b>-3 - -3.99</b>	6	20	7	7
$\leq -4$	2	10	0	2
<b>Ukupno ↓</b>	<b>125</b>	<b>762</b>	<b>506</b>	<b>167</b>
<b>Ukupno</b>	<b>415</b>	<b>1538</b>	<b>906</b>	<b>370</b>

U ovom radu smo koristili STRING za analizu listi diferencijalno eksprimiranih gena (parovi usporedbi kao u tablici 5.), i to odvojeno za gene koji su pokazali barem dvostruko povećanu ekspresiju ( $\log_2$  FC > 1) kao i za gene koji su pokazali barem dvostruko smanjenu ekspresiju ( $\log_2$  FC < -1) u promatranim parovima uzoraka. Pri analizi podataka na platformi STRING primijenjeni su sljedeći parametri: opcija pretrage literature (engl. *textmining*) je ugašena, a razina pouzdanosti je postavljena na najstrožu (90 %) s ciljem dobivanja što točnije procjene konteksta o posljedicama našeg eksperimenta. Također, radi preglednosti je u grafičkom prikazu ugašena i opcija prikazivanja čvorova (u bioinformatičari se koristi izraz engl. *nodes*) koji nisu povezani s drugim čvorovima (za vezu dva čvora se koristi izraz engl. *edges*). Drugim riječima, iz grafičkog prikaza isključeni su geni koji se nisu grupirali s nijednim drugim genom prema nekom pojmu iz baza podataka. Rezultatima svih analiza moguće je pristupiti trajnim poveznicama koje su navedene u tablici P1 (poglavlje 9. Prilozi), a u tablici 6. se nalazi sažeti prikaz rezultata prema broju pojmova koji su se pokazali značajnim (FDR < 0,05) za liste gena iz promatranih usporedbi.

Tablica 6. Sažetak obrade rezultata RNA-seq na platformi STRING. Prikazan je broj pojmova iz svake od navedenih baza (prvi stupac) za navedene uspoređivane parove (prvi red), posebno za setove gena s povećanom (oznaka ↑) i smanjenom (oznaka ↓) diferencijalnom ekspresijom prema rezultatima RNAseq.

	WT_nt vs. MUT_nt		WT_nt vs. WT_CFW		MUT_nt vs. MUT_CFW		WT_CFW vs. MUT_CFW	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
GO/ biološki proces	52	3	62	126	11	90	24	0
GO/ molekularna funkcija	2	0	2	25	0	11	4	0
GO/ stanična komponenta	20	3	24	38	5	28	3	2
KEGG	10	0	13	5	0	9	9	0
STRING klaster	8	0	6	52	2	45	2	0

## 1 Usporedba divljeg tipa i mutanta *taf144Δ* u standardnim uvjetima

Promatrali smo razliku eksprimiranih gena u divljem tipu i mutantu u standardnim uvjetima (u tablici 5. je analiza za ovaj par prikazana u stupcu WT\_nt vs. MUT\_nt). Ukupno je 415 diferencijalno eksprimiranih gena, od toga je  $\log_2 FC \geq 1$  imalo 290 gena, a  $\log_2 FC \leq -1$  je imalo 125 gena.

Geni s povećanom ekspresijom u mutanta *taf144Δ* (u odnosu na divlji tip, u standardnim uvjetima) su uključeni u 52 biološka procesa (prema GO-pojmovima), dvije molekularne funkcije (katalitička i oksidoreduktazna aktivnost), u 20 staničnih komponenti, a izdvaja se 10 pojmova prema bazi KEGG (tablica 7.) i osam STRING klastera. Među genima sa smanjenom ekspresijom u mutanta *taf144Δ* izdvojila su se po tri stanična procesa (povezana s transportom željeza) i stanične komponente.

Tablica 7. Prikaz rezultata KEGG-analize za gene s povećanom ekspresijom ( $\log_2 FC \geq 1$ ) za usporedbu divljeg tipa i mutanta *taf1444* u standardnim uvjetima.

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	strength	FDR
map00500	Starch and sucrose metabolism	13	40	0.97	1.54E-06
map00020	Citrate cycle (TCA cycle)	10	31	0.96	5.41E-05
map01200	Carbon metabolism	24	113	0.78	2.85E-09
map00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	6	29	0.77	0.0452
map00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	10	54	0.72	0.0032
map04213	Longevity regulating pathway - multiple species	7	38	0.72	0.0351
map01230	Biosynthesis of amino acids	20	124	0.66	5.55E-06
map01110	Biosynthesis of secondary metabolites	53	344	0.64	3.29E-16
map00190	Oxidative phosphorylation	11	74	0.63	0.0069
map01100	Metabolic pathways	79	767	0.47	3.45E-16

## 2 Usporedba divljeg tipa u standardnim uvjetima i pri izlaganju stresu stanične stijenke

Analizirali smo diferencijalnu ekspresiju gena kod divljeg tipa u standardnim uvjetima i pri izlaganju stresu stanične stijenke (u tablici 5. pod oznakom WT\_nt vs. WT\_CFW). Ukupno je 1538 diferencijalno eksprimiranih gena, od čega je  $\log_2 FC \geq 1$  imalo 776 gena, a  $\log_2 FC \leq -1$  su imala 762 gena. Također, unutar skupine s  $\log_2 FC \geq 1$ , po kategorijama je veći broj gena nego u ostalim uspoređivanim parovima. Tako su 42 gena u kategoriji  $\log_2 FC \geq 4$ , a u  $\log_2 FC$  3 - 3,99 je 69 gena.

Prema analizi na platformi STRING, na listi gena s povećanom ekspresijom nakon izlaganja stresu stanične stijenke izdvaja se 62 GO biološka procesa, dvije GO molekularne funkcije (katalitička i oksidoreduktazna aktivnost), 24 GO stanične komponente, 13 KEGG-pojmova (tablica 8.) i šest STRING klastera. Među genima sa smanjenom ekspresijom nakon izlaganja divljeg tipa stresu stanične stijenke dobili smo 126 pojmova iz kategorije GO biološki proces, 25 GO molekularnih funkcija, 38 GO staničnih komponenti, pet KEGG-pojmova (tablica 9.) i 52 STRING klastera.

Tablica 8. Prikaz rezultata KEGG-analize za gene s povećanom ekspresijom kod divljeg tipa nakon izlaganja stresu stanične stijenke (promatrani par WT\_nt vs. WT\_CFW).

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	strength	false discovery rate
map01100	Metabolic pathways	139	767	0.3	7.93E-12
map00500	Starch and sucrose metabolism	22	40	0.79	3.26E-07
map01110	Biosynthesis of secondary metabolites	67	344	0.34	3.89E-06
map01200	Carbon metabolism	30	113	0.47	0.00015
map00020	Citrate cycle (TCA cycle)	15	31	0.73	0.00019
map04138	Autophagy - yeast	25	85	0.52	0.00019
map00410	beta-Alanine metabolism	8	13	0.84	0.0095
map04011	MAPK signaling pathway - yeast	25	114	0.39	0.0095
map00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	12	34	0.59	0.0127
map00561	Glycerolipid metabolism	11	32	0.58	0.0247
map00051	Fructose and mannose metabolism	9	22	0.66	0.0263
map00640	Propanoate metabolism	7	14	0.75	0.0394
map00380	Tryptophan metabolism	8	20	0.65	0.05

Tablica 9. Prikaz rezultata KEGG-analize za gene sa smanjenom ekspresijom kod divljeg tipa nakon izlaganja stresu stanične stijenke (promatrani par WT\_nt vs. WT\_CFW).

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	strength	FDR
map03010	Ribosome	111	153	0.88	1.13E-47
map03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	48	74	0.83	4.41E-18
map03020	RNA polymerase	20	30	0.84	3.26E-07
map01230	Biosynthesis of amino acids	30	124	0.4	0.0026
map01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	14	35	0.62	0.0048

### 3 Usporedba mutanta *taf14ΔΔ* u standardnim uvjetima i pri izlaganju stresu stanične stijenke

Promatrali smo diferencijalnu ekspresiju mutanta *taf14ΔΔ* u standardnim uvjetima i pri izlaganju staničnom stresu tretmanom tvari Calcofluor White (u tablici 5. pod oznakom MUT\_nt vs. MUT\_CFW). Ukupno je 906 diferencijalno eksprimiranih gena, od toga je 400 gena s  $\log_2 FC \geq 1$ , dok je 506 gena s  $\log_2 FC \leq -1$ . Ovdje je u kategoriji  $\log_2 FC \geq 4$  tek šest gena, u kategoriji  $\log_2 FC -3 - -3,99$  je sedam gena,  $\log_2 FC \leq -4$  nema niti jedan gen.

Analiza na platformi STRING pokazala je da se među povećano eksprimiranim genima u mutanta *taf14ΔΔ* izdvaja 11 GO bioloških procesa, pet GO staničnih komponenti i dva STRING klastera. U kategoriji GO molekularne funkcije i KEGG-pojmovima nije bilo značajno izdvojenih pojmova. Među genima sa smanjenom ekspresijom kod mutanta *taf14ΔΔ* dobili smo 90 GO bioloških procesa, 11 GO molekularnih funkcija, 28 GO staničnih komponenti, devet KEGG-pojmova (tablica 10.) i 45 STRING klastera.

Tablica 10. Prikaz rezultata KEGG-analize za gene sa smanjenom ekspresijom kod mutanta *taf14ΔΔ* nakon izlaganja stresu stanične stijenke (promatrani par MUT\_nt vs. MUT\_CFW).

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	strength	FDR
map03010	Ribosome	101	153	0.99	3.50E-54
map03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	34	74	0.83	2.84E-13
map01230	Biosynthesis of amino acids	35	124	0.62	7.90E-09
map01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	17	35	0.85	1.15E-06
map00300	Lysine biosynthesis	9	12	1.04	0.00022
map03020	RNA polymerase	10	30	0.69	0.0116
map00220	Arginine biosynthesis	7	17	0.78	0.036
map00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	6	12	0.86	0.036
map01110	Biosynthesis of secondary metabolites	41	344	0.24	0.0382



#### 4 Usporedba divljeg tipa i mutanta *taf144A* u odgovoru na stanični stres

Usporedili smo odgovor divljeg tipa i mutanta *taf144A* na tretman tvari Calcofluor White, odnosno njihov odgovor na stres stanične stijenke (u tablici 5. pod oznakom WT\_CFW vs. MUT\_CFW). Ukupno je 370 diferencijalno eksprimiranih gena, od čega je  $\log_2 FC \geq 1$  imalo 203 gena, a  $\log_2 FC \leq -1$  je pokazalo 167 gena.

Nakon analize na platformi STRING, među genima s povećanom ekspresijom kod mutanta *taf144A* nakon izlaganja stresu stanične stijenke (u odnosu na divlji tip u istim uvjetima), izdvaja se 24 GO biološka procesa, četiri GO molekularne funkcije, tri GO stanične komponente, devet KEGG-pojmova (tablica 11.) i dva STRING klastera. Među genima sa smanjenom ekspresijom izdvojile su se samo dvije GO stanične komponente.

Tablica 11. Prikaz rezultata KEGG-analize za gene s povećanom ekspresijom kod mutanta *taf144A* nakon izlaganja stresu stanične stijenke (promatrani par WT\_CFW vs. MUT\_CFW).

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	strength	FDR
map01230	Biosynthesis of amino acids	20	124	0.9	2.35E-09
map01100	Metabolic pathways	44	767	0.45	4.50E-08
map01110	Biosynthesis of secondary metabolites	28	344	0.6	1.10E-07
map00220	Arginine biosynthesis	8	17	1.36	1.97E-06
map01200	Carbon metabolism	13	113	0.75	0.00011
map00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	7	29	1.07	0.00044
map00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	7	54	0.8	0.0129
map00270	Cysteine and methionine metabolism	6	43	0.83	0.0228
map00240	Pyrimidine metabolism	5	29	0.93	0.0266

Tablica 12. RNA-seq, rezultati diferencijalne ekspresije gena divljeg tipa prema mutantu u standardnim uvjetima. Prikazano je po 25 gena s najvišim i najnižim rezultatom.

WT_nt vs. MUT_nt				
Gen	Lokus	FDR	UNT_MUT	Opis gena
HSP26	YBR072W	0.0073091	8.045944647	Mali protein toplinskog šoka
	YLR053C	0.001736	7.598501053	Navodni protein nepoznate funkcije
TDH1	YJL052W	0.0019573	6.190965157	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
	YFR052C-A	0.0007133	5.591542651	ORF, nepotvrđen
HSP12	YFL014W	0.0007581	5.515057729	Protein plazma membrane
RRT1	YBL048W	0.0015495	5.168147952	Protein nepoznate funkcije
HXT7	YDR342C	0.0030943	5.138499452	Transporter glukoze visokog afiniteta
SOL4	YGR248W	0.0039511	5.095526144	6-fosfoglukonolaktonaza
LEE1	YPL054W	0.0071002	4.622712277	Protein nepoznate funkcije, zinc-finger
	YIL169C	0.0009409	4.517336477	Navodni protein nepoznate funkcije
HXK1	YFR053C	0.0070669	4.452384565	Heksokinazni izozim 1
YRO2	YBR054W	0.0005602	4.149989286	Protein nepoznate funkcije
UGX2	YDL169C	0.004549	4.117035685	Protein nepoznate funkcije
ARO9	YHR137W	0.0011713	4.014776205	Aromatska aminotrasferaza II
HSP78	YDR258C	0.0005602	3.880981323	Šaperon matriksa mitohondrija
	YDL124W	0.0005602	3.862792801	α-keto amidna reduktaza
HPF1	YOL155C	0.0007133	3.820498756	Manoprotein
MPC3	YGR243W	0.0011523	3.791013013	Mitohondrijski nosač piruvata
	YMR173W-A	0.0007133	3.738766838	ORF, nepotvrđen
HSP42	YDR171W	0.0017671	3.712923293	Mali protein toplinskog šoka
NCA3	YJL116C	0.0007133	3.646500626	Protein uključen u organizaciju mitohondrija
GPP2	YER062C	0.0005602	3.639514874	Glicerol-1-fosfataza
GPG1	YGL121C	0.0085927	3.639455154	γ-podjedinica G-proteina
TSL1	YML100W	0.0005602	3.606347816	Velika podjedinica trehaloza 6-fosfata
GLK1	YCL040W	0.0007133	3.553515929	Glukokinaza
...				
AFB1	YLR040C	0.00882	-2.30724711	MATα-specifični blokator faktora a
FIT3	YOR383C	0.0033132	-2.312447577	Manoprotein stanične stijenke
	YHR214C-C	0.0031176	-2.327609013	Retrotranspozon gena TYA Gag
	YMR317W	0.0081288	-2.33342803	Protein nepoznate uloge
URA3	YEL021W	0.0039511	-2.333986987	OMP-dekarboksilaza
FCY21	YER060W	0.0067268	-2.334852113	Navodna purin-citozin permeaza
YHK8	YHR048W	0.0077623	-2.367302903	Antiporter iz obitelji DHA1
OYE3	YPL171C	0.0055319	-2.367752086	NADPH oksidoreduktaza
	YDL241W	0.0019573	-2.420802585	Navodni protein nepoznate funkcije
	YJR030C	0.0033758	-2.499692763	Navodni protein nepoznate funkcije
DCG1	YIR030C	0.0038344	-2.522879311	Protein nepoznate funkcije
	YBL113C	0.0031358	-2.525357781	Protein sličan helikazi
APN2	YBL019W	0.0072164	-2.587946174	Abazična endonukleaza klase II
AAH1	YNL141W	0.0025235	-2.613506204	Adenin deaminaza/aminohidrolaza
FRE2	YKL220C	0.0031188	-2.807022362	Reduktaza željeza i bakra
ATF2	YGR177C	0.0048415	-2.883312109	Alkohol acetiltransferaza
AAC3	YBR085W	0.002015	-2.994320353	Translokator ADP/ATP na unutrašnjoj membrani mitohondrija
FRE3	YOR381W	0.0009544	-3.006669686	Reduktaza željeza
ENB1	YOL158C	0.0009683	-3.206362368	Endosomalni transporter željeza
TAF14	YPL129W	0.0005602	-3.221426557	Transkripcijski faktor
	YNL285W	0.0053763	-3.302982692	ORF, nepotvrđen
HFM1	YGL251C	0.0083787	-3.397599588	DNA helikaza (specifična za mejozu)
FRE4	YNR060W	0.0007581	-3.629815293	Reduktaza željeza
TIR1	YER011W	0.001736	-4.047070685	Manoprotein stanične stijenke
	YBR013C	0.0041442	-4.050312227	Navodni protein nepoznate funkcije

Tablica 13. RNA-seq, rezultati diferencijalne ekspresije gena kod divljeg tipa u standardnim uvjetima i pri stresu stanične stijenke. Prikazano je po 25 gena s najvišim i najnižim rezultatom.

WT_nt vs. WT_CFW				
Gen	Lokus	FDR	CFW_WT	Opis gena
PIR3	YKL163W	0.000130948	7.7517064	O-glikozilirani protein stanične stijenke
RTC3	YHR087W	5.92172E-05	6.7800672	Protein nepoznate funkcije
PAU2	YEL049W	0.000948604	6.7671995	Član multigenske obitelji seripauperina
UGX2	YDL169C	0.000201172	6.1956884	Protein nepoznate funkcije
PRM5	YIL117C	5.83904E-05	6.0198266	Protein reguliran feromonima, CWI put
HSP12	YFL014W	4.59949E-05	5.8539742	Protein plazma membrane
CRG1	YHR209W	4.23023E-05	5.819381	Metiltransferaza ovisna o S-AdoMet
CWP1	YKL096W	1.4923E-05	5.7632533	Manoprotein stanične stijenke
	YLR042C	2.1962E-05	5.5700536	Protein stanične stijenke nepoznate funkcije
RRT1	YBL048W	0.005003901	5.5558124	Protein nepoznate funkcije
GPP2	YER062C	1.4923E-05	5.3554252	Glicerol-1-fosfataza
	YFR052C-A	0.000465213	5.2424745	ORF, nepotvrđen
PHM8	YER037W	0.007597186	5.1885672	LPA fosfataza, nukleotidaza
	YDR034W-B	0.000469044	5.1613569	Protein plazma membrane
RRT16	YNL105W	0.008664884	5.1469349	ORF, nepotvrđen
STL1	YDR536W	0.000162508	5.0875845	Glicerol proton simporter na plazma membrani
	YMR173W-A	4.59949E-05	5.0805561	ORF, nepotvrđen
FMP33	YJL161W	5.08214E-05	5.0448347	Navodni protein nepoznate funkcije
NCA3	YJL116C	5.32447E-05	4.9700578	Protein uključen u organizaciju mitohondrija
GPG1	YGL121C	0.000617154	4.9185595	γ-podjedinica G-proteina
KDX1	YKL161C	4.59949E-05	4.8799435	Protein kinaza iz puta MAPK
AMS1	YGL156W	5.68847E-05	4.8389562	α-manozidaza vakuole
	YKL107W	0.000310137	4.7737048	Vjerojatni membranski protein; dehidrogenaza/reduktaza
SPO75	YLL005C	0.001199674	4.766696	Protein nepoznate funkcije specifičan za mejozu
	YHR033W	0.000537388	4.7473147	Navodni protein nepoznate funkcije
...				
SPO16	YHR153C	0.002716481	-3.137039	Protein specifičan za mejozu; potreban za sporulaciju
DSE2	YHR143W	0.000443853	-3.1513	Sekretorni protein sličan glukanazi, luči ga stanica kćer
SUN4	YNL066W	6.20133E-05	-3.205267	Protein stanične stijenke, povezan s glukanazama
DHR2	YKL078W	0.001200551	-3.249205	ATP-ovisna RNA-helikaza, dominantno u jezgri
DBP2	YNL112W	0.00033553	-3.295674	ATP-ovisna RNA-helikaza, DEAD-box obitelj proteina
GFD2	YCL036W	0.000299932	-3.301278	Protein nepoznate funkcije
	YKR040C	0.002069473	-3.346541	ORF, nepotvrđen
SCW11	YGL028C	0.000126574	-3.447014	Protein stanične stijenke, povezan s glukanazama
	YLR285C-A	5.32447E-05	-3.483557	Navodni protein nepoznate funkcije
	YLR366W	0.004000518	-3.507921	ORF, nepotvrđen
	snR17b	0.001143662	-3.514844	snoRNA U3
GUP2	YPL189W	0.001712604	-3.691976	Vjerojatni membranski protein
	YMR030W-A	0.000946928	-3.768694	Navodni protein nepoznate funkcije
PRY3	YJL078C	7.6918E-05	-3.769521	Protein iz obitelji CAP, povezan sa staničnom stijenkom
RKI1	YOR095C	5.32447E-05	-3.819261	Riboza-5-fosfat ketol-izomeraza; put pentozna fosfata
SIT1	YEL065W	5.32447E-05	-4.014986	Ferioksamin B-transporter, obitelj ARN
ENB1	YOL158C	8.38097E-05	-4.016331	Endosomalni transporter željeza
AAH1	YNL141W	8.46312E-05	-4.026819	Adenin deaminaza/aminohidrolaza
EGT2	YNL327W	0.000130415	-4.081495	GPI-usidrena endoglukanaza stanične stijenke
ARN2	YHL047C	5.50114E-05	-4.105923	Transporter iz obitelji ARN
FET3	YMR058W	1.74817E-05	-4.156775	Fero-O2-oksidoreduktaza
DSE4	YNR067C	7.81947E-05	-4.207273	Sekretorni protein sličan glukanazi, luči ga stanica kćer
DSE1	YER124C	0.000392847	-5.07096	Protein specifičan za stanicu kćer
FRE4	YNR060W	2.93526E-05	-5.266559	Reduktaza željeza
FIT2	YOR382W	7.65257E-05	-5.452308	Manoprotein stanične stijenke

Tablica 14. RNA-seq, rezultati diferencijalne ekspresije gena kod mutanta *taf14ΔΔ* u standardnim uvjetima i pri stresu stanične stijenke izlaganjem tvari CFW. Prikazano je po 25 gena s najvišim i najnižim rezultatom.

MUT_nt vs. MUT_CFW				
Gen	Lokus	FDR	CFW_MUT	Opis gena
PIR3	YKL163W	8.96E-07	5.94437192	O-glikozilirani protein stanične stijenke
PRM5	YIL117C	8.96E-07	4.53650734	Protein reguliran feromonima, CWI put
CRG1	YHR209W	1.54949E-06	4.32828068	Metiltransferaza ovisna o S-AdoMet, homeostaza lipida
YPS6	YIR039C	0.000216289	4.32018868	Navodna GPI-usidrena proteaza iz obitelji japsina
	YNR066C	0.000289209	4.201917	Navodni membranski protein nepoznate funkcije
CWP1	YKL096W	2.00902E-05	4.06518063	Manoprotein stanične stijenke
SRL3	YKR091W	1.33955E-06	3.95367401	Protein s motivom GTB
	YDR034W-B	1.28518E-05	3.88158116	Vjerojatni protein plazma membrane
AFR1	YDR085C	9.19431E-06	3.81983347	Protein nužan za oblik <i>shmoo</i> , regulira strukturu septina
FMP33	YJL161W	3.87294E-05	3.79149577	Navodni protein nepoznate funkcije
KTR2	YKR061W	1.28518E-05	3.6726138	Manozil-transferaza za N-vezane glikozilacije proteina
	YOL159C	2.00564E-05	3.58497338	Topivi protein nepoznate funkcije
	YNR065C	2.00564E-05	3.53728688	Protein nepoznate funkcije
	YKL107W	0.000448531	3.5163986	Navodna dehidrogenaza/reduktaza; membranski protein
	YJL132W	0.000102187	3.49415459	Navodni protein nepoznate funkcije
	YPR077C/YPR078C	8.87735E-05	3.48691162	ORF, nepotvrđen
PST1	YDR055W	2.13616E-05	3.37813675	Protein stanične stijenke, up-reguliran aktivacijom CWI puta
	YKL053W	0.000427137	3.34538172	ORF, nepotvrđen
SRX1	YKL086W	0.00015521	3.33400212	Sulfiredoksin
GDE1	YPL110C	7.9299E-06	3.18075236	Glicerofosfokolin fosfodiesteraza
	YGR174W-A	0.000377118	3.11376169	Navodni protein nepoznate funkcije
	YLR042C	6.24105E-05	3.11205608	Protein stanične stijenke nepoznate funkcije
AMS1	YGL156W	2.74937E-05	3.10450933	α-manozidaza vakuole
	YLR194C	1.00109E-05	3.09835867	Strukturni protein stanične stijenke
	YLR428C	6.24105E-05	3.00272897	ORF, nepotvrđen
...				
ARN2	YHL047C	6.49452E-05	-2.40790187	Transporter iz obitelji ARN
ARN1	YHL040C	0.000211717	-2.42897073	Transporter iz obitelji ARN
HPF1	YOL155C	9.49712E-05	-2.50002971	Manoprotein
	YLR285C-A	1.76457E-05	-2.51211864	Navodni protein nepoznate funkcije
AIM44	YPL158C	0.000371027	-2.54700048	Protein koji regulira Cdc42 i Rho1
FRE1	YLR214W	0.000113376	-2.56174829	Reduktaza željeza i bakra
	YGR035C	0.002104629	-2.61238	Navodni protein nepoznate funkcije, potencijalni supstrat Cdc28
ARG1	YOL058W	5.04638E-05	-2.62270921	Arginosukcinat sintetaza
LYS20	YDL182W	6.10056E-05	-2.63782798	Izozim homocitrat sintaze
SCW11	YGL028C	0.000102195	-2.64197235	Protein stanične stijenke sličan glukanazama
	YIL169C	0.000148789	-2.6613928	Navodni protein nepoznate funkcije
FIT2	YOR382W	6.10056E-05	-2.69142977	Manoprotein stanične stijenke
FET3	YMR058W	9.86301E-06	-2.70792749	Fero-O <sub>2</sub> -oksidoreduktaza
SUN4	YNL066W	4.8392E-05	-2.72648573	Protein stanične stijenke povezan s glukanazama
CLB2	YPR119W	0.000356009	-2.81151415	Ciklin tipa B; progresija kroz stanični ciklus
LEU9	YOR108W	7.14645E-05	-2.83831705	α-izopropilmalat sintaza II
AIM20	YIL158W	8.67461E-05	-2.84839141	Navodni protein nepoznate funkcije
SIT1	YEL065W	9.55663E-06	-2.85773615	Ferioksamin B transporter; obitelj ARN
CLB1	YGR108W	6.08221E-05	-3.1398637	Ciklin tipa B; progresija kroz stanični ciklus
PRY3	YJL078C	0.000114279	-3.23403988	Protein stanične stijenke; eksport sterola
DSE1	YER124C	6.10056E-05	-3.28900482	Protein specifičan za stanice kćeri
DSE2	YHR143W	8.87735E-05	-3.29330141	Protein specifičan za stanice kćeri, sličan glukanazama
	YMR030W-A	0.000270991	-3.55350907	Navodni protein nepoznate funkcije
EGT2	YNL327W	0.000158774	-3.59547732	GPI-usidrena endoglukanaza stanične stijenke
DSE4	YNR067C	4.60258E-05	-3.7422077	Protein specifičan za stanice kćeri, sličan glukanazama

Tablica 15. RNA-seq, rezultati diferencijalne ekspresije gena kod divljeg tipa i mutanta *taf14ΔΔ* pri stresu stanične stijenke. Prikazano je po 25 gena s najvišim i najnižim rezultatom.

WT_CFW vs. MUT_CFW				
Gen	Lokus	FDR	CFW_MUT	Opis gena
TDH1	YJL052W	3.34E-06	4.6419473	Gliceralehid 3-fosfat dehidrogenaza
HSP26	YBR072W	0.0002165	4.0698887	Mali protein toplinskog šoka
	YGL007C-A	6.71E-05	3.9988649	Navodni protein nepoznate funkcije
YRO2	YBR054W	2.017E-05	3.8154069	Protein nepoznate funkcije, sličan rodopsinima
SLO1	YER180C-A	0.0008753	3.5307886	Protein koji se veže na Arl3 (GTP-aza iz obitelji Ras)
PRM7	YDL039C	3.125E-05	3.2578738	Protein reguliran feromonima
	YIL169C	0.0019938	3.1470159	Navodni protein nepoznate funkcije
	YDR274C	0.0095311	3.0611456	ORF, nepotvrđen
YGP1	YNL160W	0.0001853	2.9478029	Sekretorni glikoprotein, povezan sa staničnom stijenkom
HPF1	YOL155C	0.0007174	2.8782549	Manoprotein
	YJL133C-A	4.019E-06	2.8594957	Navodni protein nepoznate funkcije
SUF16	tG(GCC)C	0.0019124	2.8038754	Glicin-tRNA
	tL(CAA)G1	0.0004316	2.7690862	Leucin-tRNA
PHO84	YML123C	0.0021329	2.7167058	Transporter anorganskog fosfata visokog afiniteta
URA2	YJL130C	4.019E-06	2.5703669	Enzim u <i>de novo</i> biosintezi pirimidina
SPR28	YDR218C	0.0013105	2.5445915	Homolog CDC3/10/11/12, specifičan za sporulaciju
	tK(CUU)D1	0.0097337	2.4331587	Lizin tRNA
POX1	YGL205W	0.0020787	2.3970515	Oksidaza; β-oksidacija masnih kiselina
ADH4	YGL256W	3.105E-05	2.3422204	Izozim alkohol dehidrogenaze, tip IV
	tG(GCC)P2	0.0094045	2.3294277	Glicin tRNA
ADR1	YIL046W-A	0.0078316	2.3137789	Navodni protein nepoznate funkcije
	YHR071C-A	0.0065786	2.3062902	ORF, nepotvrđen
	YDR216W	4.068E-05	2.2991321	Transkripcijski faktor s cink-prstenom, ovisan o izvoru ugljika
	YFR020W	0.0002496	2.2988448	Protein nepoznate funkcije
	snR24	0.0019938	2.2803448	snoRNA
...				
IMA1	YGR287C	0.0016157	-2.050358	Glavna izomaltaza
TPP1	YMR156C	0.0029119	-2.125818	DNA 3'-fosfataza, popravak endogenog oštećenja dsDNA
XYL2	YLR070C	0.0065786	-2.277916	Ksilitol dehidrogenaza
	YBL113C	0.0014057	-2.317905	Protein sličan helikazi
FMS1	YCR099C	0.0001197	-2.325774	Navodni protein nepoznate funkcije
	YHR097C	0.0001272	-2.458019	Navodni protein nepoznate funkcije
	YMR020W	0.000411	-2.482872	Poliamin oksidaza
THI11	YJR156C	0.0055871	-2.532992	Protein uključen u sintezu tiaminskog prekursora HMP
	tN(GUU)Q	0.0014226	-2.545311	Mitondrijska asparagin tRNA
SAY1	YGR263C	0.001	-2.581175	Sterol deacetilaza
NQM1	YGR043C	0.0033151	-2.60087	Transaldolaza nepoznate funkcije
	YGR035C	0.0013105	-2.636437	Navodni protein nepoznate funkcije
RTC3	YHR087W	6.403E-06	-2.67381	Protein nepoznate funkcije, uključen u metabolizam RNA
CLB1	YGR108W	0.0002165	-2.696166	Ciklin B-tipa, progresija kroz stanični ciklus
AAD3	YCR107W	0.00095	-2.930954	Navodna aril-alkohol dehidrogenaza
CSI1	YMR025W	0.0017322	-2.941382	Podjedinica kompleksa Cop9
THI12	YNL332W	0.0015013	-3.079907	Protein uključen u sintezu tiaminskog prekursora HMP
	YER188W	0.0035598	-3.103733	ORF, nepotvrđen
	YLR042C	3.34E-06	-3.136613	Protein stanične stijenke, nepoznate funkcije
AFB1	YGR122C-A	0.0036461	-3.146806	ORF, nepotvrđen
	YLR040C	2.429E-05	-3.605778	MATα-specifični blokator faktora a
	YGR066C	0.0014646	-3.693992	Navodni protein nepoznate funkcije
TAF14	YPL129W	2.017E-05	-3.833746	Transkripcijski faktor
TIR1	YER011W	7.209E-05	-4.146772	Manoprotein stanične stijenke
DCG1	YIR030C	0.0026817	-4.754796	Protein nepoznate funkcije



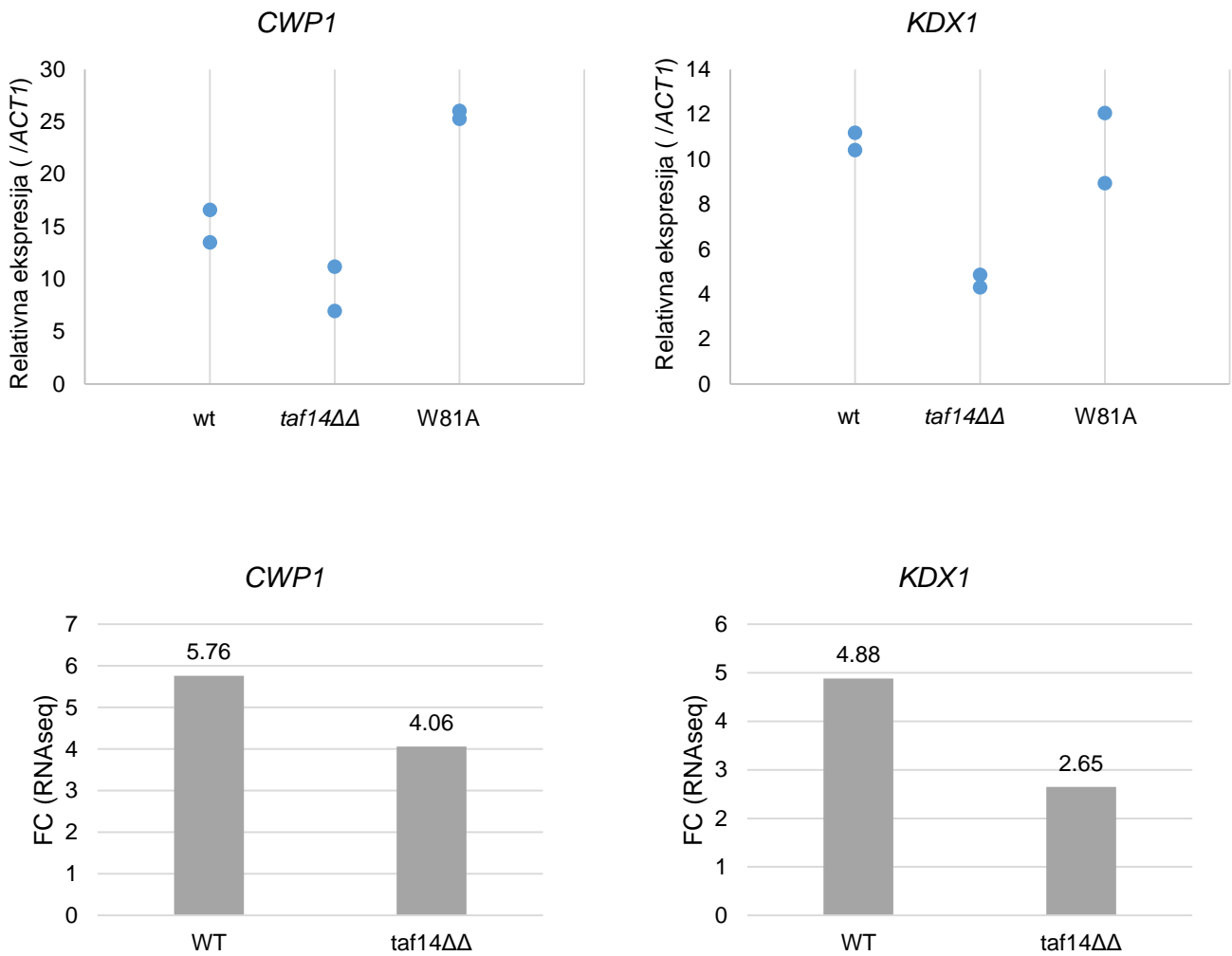
## Analiza ekspresije gena pri stresu stanične stijenke metodom qPCR

Prema podacima iz literature, izdvojili smo nekoliko gena za koje je poznato da im se ekspresija povećava odnosno smanjuje pri stresu stanične stijenke te provjerili njihovu relativnu ekspresiju metodom qPCR. Uvjeti uzgoja jednaki su onima kod pripreme za RNAseq analizu, a detalji su opisani u poglavlju Metode. Ukratko, ispitivani sojevi su uzgajani u standardnom mediju do udvostručenja, potom su izloženi dvosatnom tretmanu s tvari Calcofluor White koja dovodi do stresa stanične stijenke. Uzorci su izdvojeni prije i nakon tretmana.

Podaci dobiveni nakon umnažanja, obrađeni su metodom  $\Delta\Delta\text{Ct}$  u kojoj se normaliziraju vrijednosti za promatrani gen prema stabilno eksprimiranom genu, a potom i vrijednosti za promatrane uvjete prema kontrolnim uvjetima. Napravljena je normalizacija prema vrijednostima za *ACT1* i *TDH3* te su dobiveni istovjetni rezultati. Grafovi pokazuju vrijednost relativne ekspresije, odnosno FC (engl. *fold change*;  $\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ).

Promatrani su kvasci divljeg tipa (diploid MATa/ $\alpha$ ), mutant *taf14 $\Delta\Delta$* , komplementacijski soj *taf14 $\Delta\Delta$*  s cijelim genom *TAF14* i promotorskom regijom na plazmidu, te soj *taf14 $\Delta\Delta$*  s plazmidom koji nosi cijelu uputu za *TAF14* ali s točkastom mutacijom W81A.

Rezultati za relativnu ekspresiju gena *CWPI* i *KDX1* (slika 28., gornji red) pokazuju manje relativne ekspresije kod mutanta *taf14 $\Delta\Delta$*  u odnosu na divlji tip. Točkasti mutant pokazuje veću (*CWPI*) ili jednaku (*KDX1*) ekspresiju u odnosu na divlji tip. Usporedimo li rezultate relativne ekspresije za divlji tip i mutant *taf14 $\Delta\Delta$*  s onima dobivenim istovjetnim usporedbama metodom RNAseq (slika 28., donji red), vidimo da se trendovi poklapaju.



Slika 28. Grafički prikaz rezultata dobivenih metodom qPCR i RNAseq za gene na čiju ekspresiju utječe stres stanične stijenke. Uzorci su uzgojeni kako je opisano u tekstu. Gornji red prikazuje rezultate dobivene metodom qPCR, a donji red rezultate analize RNAseq. Analiza rezultata metode qPCR je napravljena metodom  $\Delta\Delta C_t$  gdje su podaci normalizirani prema referentnom genu *ACT1* i prema rezultatima za uzorak prije tretmana ispitivanom tvari (CFW). Relativna ekspresija je vrijednost FC (engl. *fold change*;  $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Prikazana dva podatka za svaki konstrukt kvasca odnose se na dva neovisna uzgoja, a predstavljaju aritmetičke sredine dva tehnička replikata. Analiza rezultata metode RNAseq prikazana je iz podataka o diferencijalnoj ekspresiji i prikazuje vrijednost dobivenu usporedbom razine očitavanja tretiranog uzorka (CFW) prema netretiranom uzorku uzgojenom bez izazivanja stresa stanične stijenke.

### 3.3. Utjecaj mutacije *TAF14* na filamentaciju

#### 3.3.1. Fenotipske analize rasta pseudohifa i stvaranja biofilma

Analize sposobnosti filamentacije ovdje su prikazane na modelnom kvascu *S. cerevisiae*, koji godinama služi kao pouzdan model za proučavanje ključnih faktora virulencije patogenih gljivica (sposobnost filamentacije i stvaranja biofilma). Ipak, obzirom da modelni kvasac *S. cerevisiae* filamentaciju ne koristi primarno kao mehanizam koji služi za patogenost, često se govori o rastu pseudohifa. Ispitana je sposobnost kvasca za širenje podlogom (formiranje "tepiha"), za prodiranje u podlogu i prijanjanje na podlogu (stvaranje biofilma) i rast pseudohifa u nepovoljnim uvjetima.

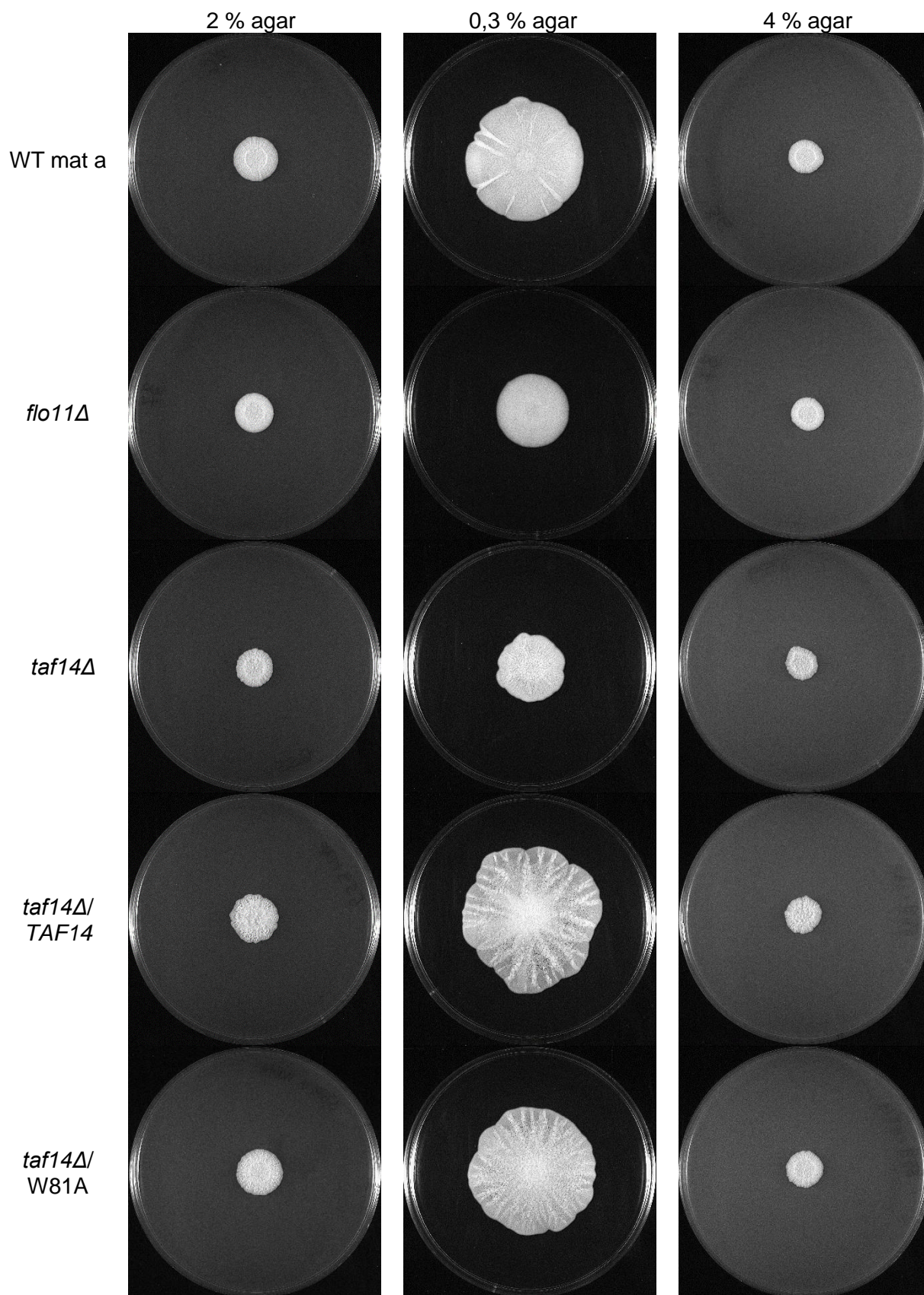
Fenotipske analize su napravljene u pozadinskom soju  $\Sigma 1278$  koji je primjeren za ove testove. Zajedno s ispitivanim sojevima, korišten je i mutant *flo11Δ* - soj kojem nedostaje uputa za ključan gen za proces filamentacije, adhezije i invazije te služi kao negativna kontrola.

#### **Ispitivanje sposobnosti širenja po podlozi**

Analiza sposobnosti stvaranja "tepiha" (engl. *mat formation assay*) napravljena je na haploidnim sojevima u pozadini  $\Sigma 1278$ . Ovaj test razvili su Reynolds i Fink (2001) koji su za svoj rad zaslužili i naslovnicu časopisa Science. Metode se koriste i danas, uz manje izmjene (pregled metoda istraživanja filamentacije se može naći u članku Cullen, 2015).

U interpretaciji rezultata testa formiranja tepiha, promatra se površinska struktura kvasca nakon do dva tjedna uzgoja pri sobnoj temperaturi na podlozi s malim udjelom agara. Ovdje su prikazani rezultati deveti dan od naciepljivanja kultura (slika 29.) Divlji tip kvasca pokazuje zrakastu strukturu s izdvojenim "listovima" nepravilnog rasporeda, reljefaste površine. Kod mutanta *flo11Δ*, očekivano, izostaje formiranje takve reljefaste i zrakaste strukture te je površina ravna i sjajna. Mutant *taf14Δ* raste sporije, zauzima površinu promjera kao kod kvasca *flo11Δ*, ali uz formiranje reljefastih i zrakastih struktura, ipak manje istraženih nego kod divljeg tipa. Dugotrajnijim uzgojem se ovaj odnos ne mijenja. Sojevi koji na plazmidu nose gen za komplementaciju divljeg tipa *TAF14* i mutanta W81A šire se podlogom brže od divljeg tipa uz izraženije zrakaste strukture koje se izdvajaju poput latica kod komplementa *TAF14*, i čitava struktura je reljefastija (zrnatija).

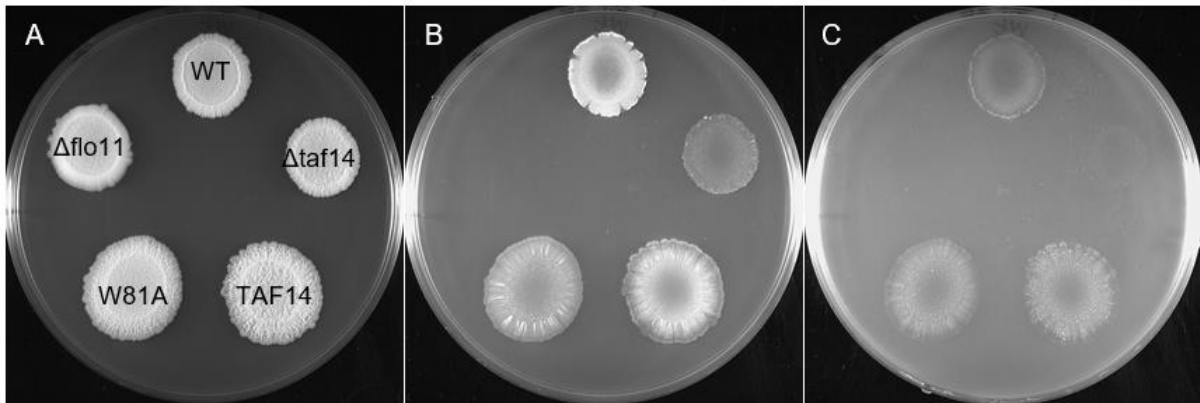




Slika 29. Rezultati testa formiranja "tepiha". Na podlozi s 0,3 % agara nakon 9 dana, divlji tip pokazuje zrakastu strukturu koja, očekivano, izostaje kod *flo11Δ* koji ima glatku i sjajnu površinu. Mutant *taf14Δ* pokazuje slabije definirane zrakaste strukture dok sojevi kojima je na plazmidu vraćen divlji tip *TAF14* ili *W81A* pokazuju rast na većoj površini i razgranatiju strukturu od divljeg tipa.

## Test prodiranja u podlogu

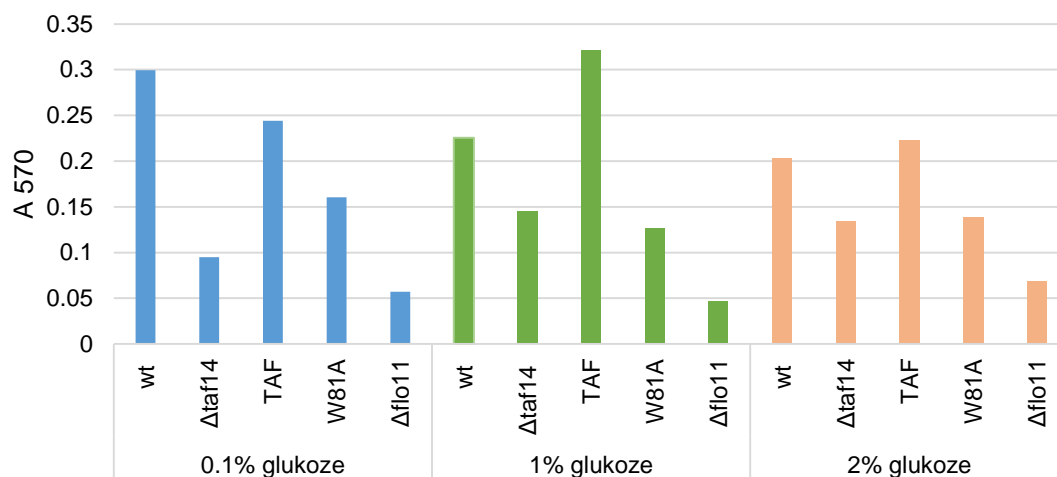
Nakon dužeg uzgoja kvasaca na standardnoj podlozi YPD pri sobnoj temperaturi (slika 30.A), provjerena je sposobnost prodiranja kvasaca u podlogu. Kvasci su prvo ispirani mlazom vode dok se nije isprao soj *flo11Δ* za koji je poznato da ne prijanja na/u podlogu (slika 30.B). Potom se površinom podloge lagano i jednolično prelazi prstom u rukavici kako bi se isprali i sojevi koji nisu prodrli dublje u podlogu (slika 30.C). Nakon oba ispiranja, vidljivo je da su divlji tip i sojevi s plazmidima za komplementaciju *TAF14* i *W81A*, prodrli unutar hranjive podloge dok se *taf14Δ* potpuno isprao. Dakle, soj *taf14Δ* je nakon dugotrajnog uzgoja, slabo prionio na površinu hranjive podloge (slika 30.B), i nije došlo do invazije u podlogu (slika 30.C).



Slika 30. Rezultati testa prijanjanja u podlogu. Na slici A prikazane su oznake nasadenih sojeva i rezultat rasta prije ispiranja i trljanja. Slika B prikazuje istu podlogu nakon ispiranja pod mlazom vode, a slika C nakon dodatnog trljanja prstom. Vidljivo je da kod sojeva divljeg tipa, komplementacijskih sojeva *TAF14* i *W81A* dolazi do prodiranja u podlogu. Kod mutanta *taf14Δ* dolazi do prodiranja, ali manje dubokog jer nakon trljanja površine nema vidljivih tragova prodiranja u dubinu podloge. Soj *flo11Δ* je kontrolni soj koji nema sposobnost vezanja i prodiranja u podlogu. Prikazan je reprezentativni set, a istovjetni eksperiment je ponavljen najmanje tri puta.

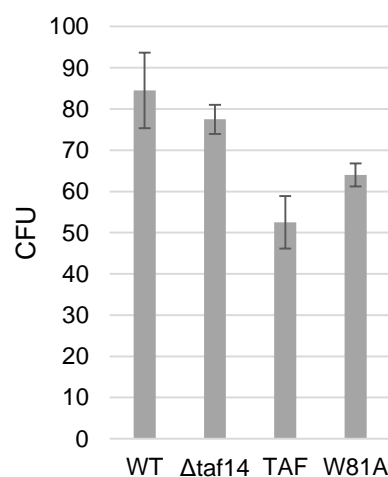
## Formiranje biofilma

Okoliš u kojem je ograničen izvor ugljika aktivira, među ostalim, stvaranje biofilma kod kvasaca. Testirana je sposobnost ispitivanih sojeva za prijanjanje na polistiren uz kvantifikaciju rezultata bojanjem tvari Crystal violet i mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 570 nm, kako je opisano u Metodama. Ovim testom dobivamo uvid u sposobnost soja za stvaranje biofilma. Slika 31. prikazuje rezultate za sojeve u pozadini  $\Sigma 1278$  (MATa), a eksperiment je napravljen i za haploid MAT  $\alpha$  i diploid s istovjetnim rezultatima. Uz ovaj test, izdvojen je i alikvot početne testirane kulture za prebrojavanje (CFU) kako bi se eliminirao utjecaj različitog broja živih stanica na rezultate eksperimenta. U uvjetima s 0,1 % glukoze u podlozi, razlike su najizraženije. Razina očitane apsorbancije koja odgovara formiranom biofilmu, za mutant *taf14Δ* odgovara 1/3 razine onoga očitano za divlji tip, i oko 40 % je veći od razine negativne kontrole *flo11Δ*. Ipak, pri 1 % i 2 % glukoze *taf14Δ* pokazuje veće razine formiranog biofilma nego pri 0,1 %, i na istoj razini kao komplementacijski soj W81A. Komplementacijski soj *TAF14* pokazuje razine formiranog biofilma kao divlji tip ili nešto veće.



Slika 31. Grafički prikaz rezultata kvantifikacije formiranog biofilma na polistirenu (gore). Prikazana je prosječna vrijednost mjerenja svakog soja u triplicatu za svaku koncentraciju glukoze, na istoj polistirenskoj mikrotitarskoj pločici (standardna devijacija < 2,5 %). Istovjetni eksperiment ponovljen je tri puta.

(Desno) Rezultati prebroja CFU (engl. *colony forming units*) iz alikvota početne kulture za prikazani test formiranja biofilma. Alikvoti su razrijeđeni do  $10^{-4}$ , jednaki volumen nasaden je na po tri hranjive podloge te su treći dan prebrojane kolonije. Prikazana je srednja vrijednost rezultata s tri podloge uz standardnu devijaciju.

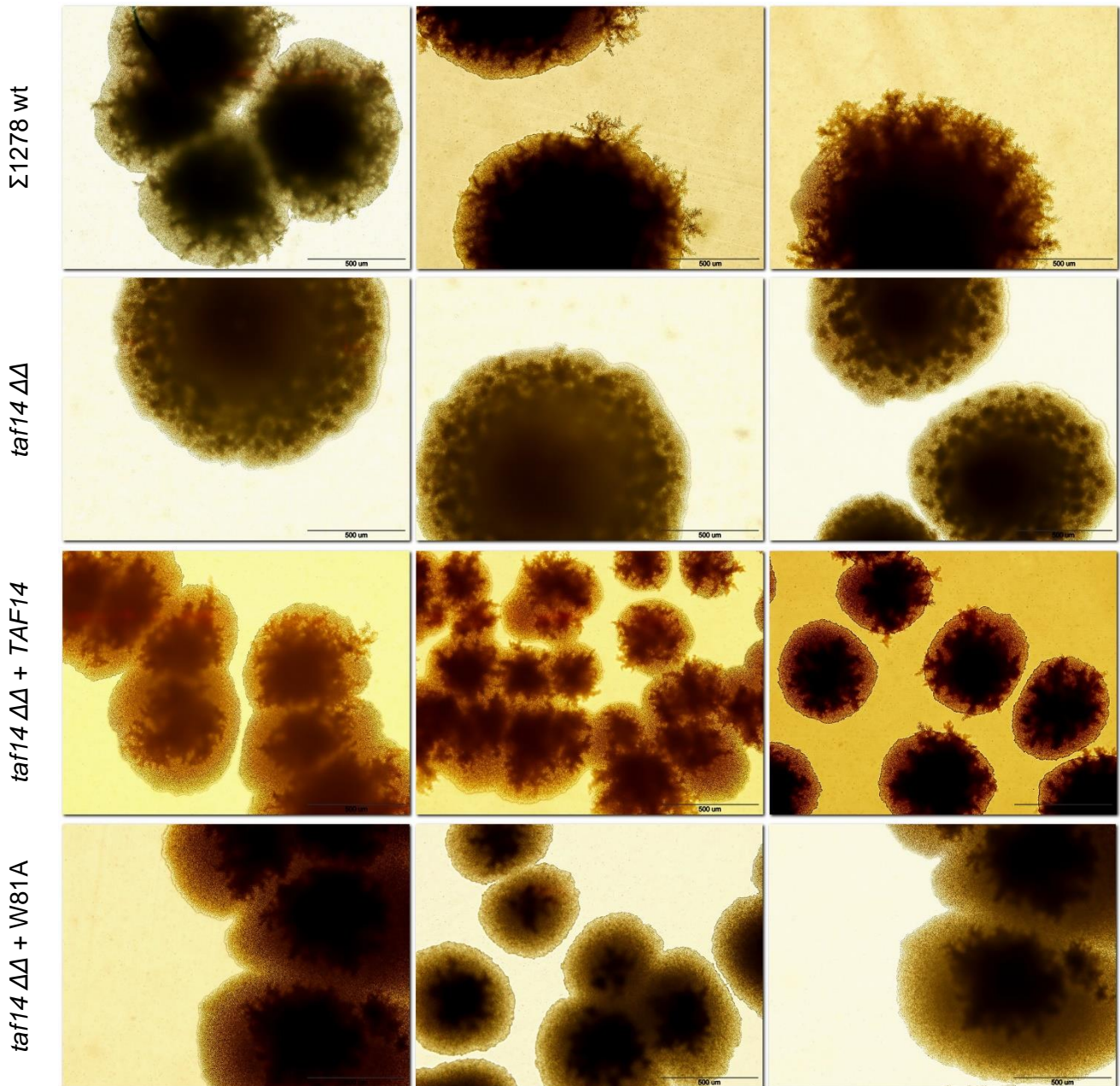


## SLAD

Kako je već spominjano, u uvjetima ograničenih nutrijenata, kvasci, kao nepokretni organizmi, pokušavaju doći do okoliša s povoljnijim uvjetima formirajući filamente ili pseudohife. Ovdje smo promatrali stvaranje pseudohifa kod sojeva koji su uzgajani u uvjetima s ograničenim dušikom (kako je opisano u Metodama). Podloga SLAD sadrži 1000 puta manji udio amonijeva sulfata kao izvora dušika (koncentracija 50 mM u standardnoj hranjivoj podlozi, 50  $\mu$ M u podlozi SLAD). Kvasci uzgajani u takvim uvjetima promatrani su pod svjetlosnim mikroskopom i fotografirani. Rezultati pokazuju jasne filamente kod divljeg tipa soja  $\Sigma$ 1278 i



komplementacijskog soja s *TAF14* (slika 32.). Homozigotni mutant *taf14ΔΔ* pokazuje zrnaste strukture unutar površine kolonije, ali bez razgranatih filamenata, dok komplementacijski soj W81A pokazuje nešto razgranatih struktura koje ipak ne prelaze rub kolonije.



Slika 32. Mikroskopski prikaz kolonija diploidnih sojeva kvasaca koji su rasli u uvjetima ograničenih izvora dušika (podloga SLAD) koji bi trebali potaknuti stvaranje pseudohifa/filamenata. Skala na svakoj fotografiji označava 500 μm. Za svaki soj su prikazane tri reprezentativne fotografije u redu.

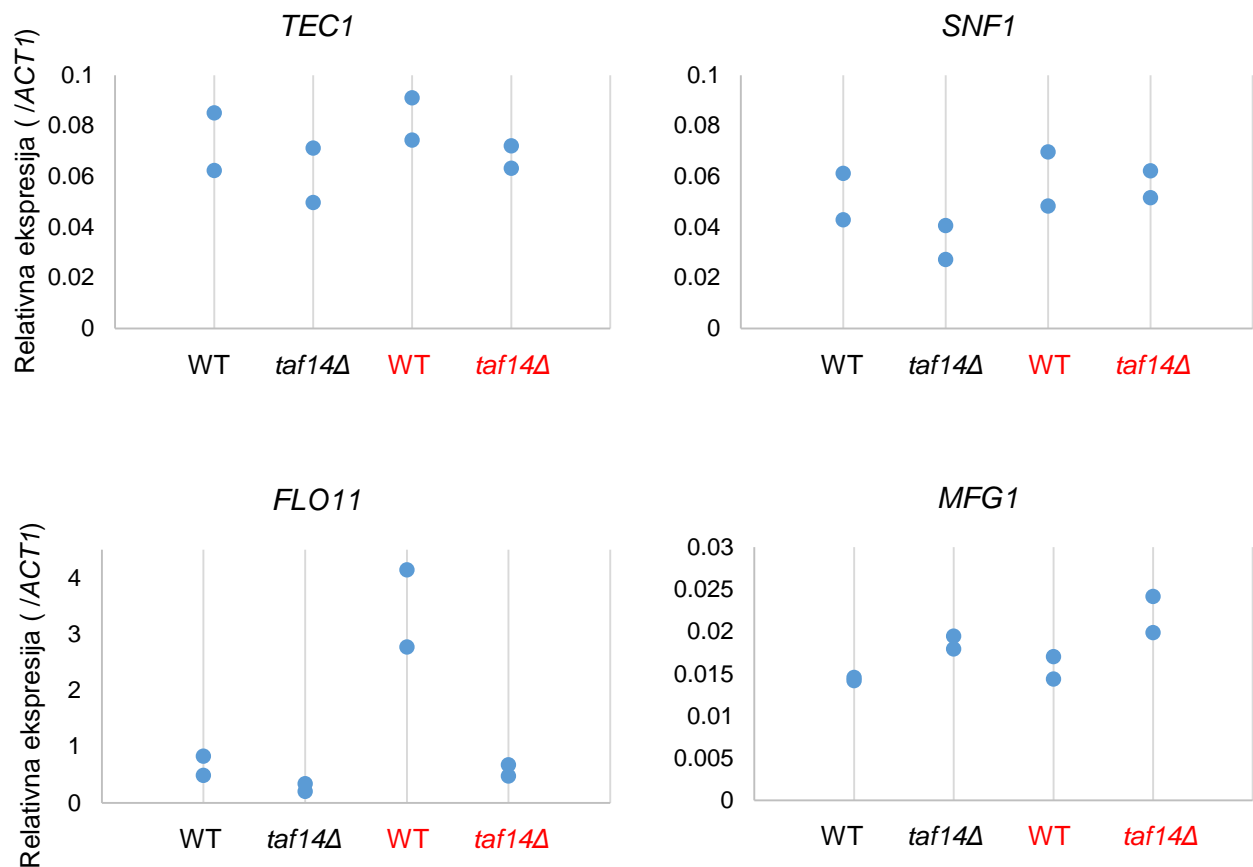
### 3.3.2. Analiza ekspresije gena uključenih u filamentaciju

Da bismo analizirali moguću ulogu proteina Taf14 u filamentaciji, izložili smo divlji tip soja  $\Sigma 1278$  i mutante *taf14 $\Delta$*  uvjetima koji potiču filamentaciju. Sojevi su uzgajani u standardnom mediju YPD u kojem je udio glukoze 2 % i u mediju YP s niskim udjelom glukoze od 0,1 %. Slaba dostupnost glukoze jedan je od poznatih čimbenika koji potiču kvasac na izduživanje i filamentaciju.

Metodom qPCR provjerili smo u ova dva soja ekspresiju gena *TEC1*, *SNF1*, *FLO11* i *MFG1* koji su ključni za filamentaciju (slika 33.). Podaci o Ct vrijednostima su obrađeni metodom  $\Delta$ Ct te su vrijednosti za ispitivane gene normalizirane prema vrijednostima za gene sa stabilnom ekspresijom (*ACT1* i *TDH3*). S obje normalizacije su dobiveni istovjetni rezultati, a ovdje su prikazani rezultati prema *ACT1*. Na grafu je prikazana relativna ekspresija, odnosno vrijednost FC (engl. *fold change*). Za svaki promatrani uzorak - divlji tip i mutant u standardnim uvjetima (crnim slovima na grafu), pa divlji tip i mutant pri induciranoj filamentaciji (crvenim slovima na grafu), prikazana su po dva podatka. Prikazani parovi podataka prikazuju aritmetičke sredine tehničkih replikata za dva neovisna uzgoja.

Rezultati relativne ekspresije za gene *TEC1*, *SNF1* i *MFG1* pokazuju da među ispitivanim uzorcima nema važne razlike. Skala vrijednosti FC prikazana je do 0,1, a podaci za ispitivane sojeve se gotovo preklapaju pa zaključujemo da indukcija filamentacije nakon 90 minuta ne pokazuje razliku u aktivaciji transkripcije kod divljeg tipa i mutanta *taf14 $\Delta$* , niti u odnosu na standardne uvjete.

Suprotno tome, rezultati relativne ekspresije gena *FLO11* pokazali su razliku u ekspresiji divljeg tipa i mutanta *taf14 $\Delta$*  pri indukciji filamentacije. U standardnim uvjetima, ekspresija gena *FLO11* je na jednakoj, niskoj razini kod divljeg tipa i mutanta *taf14 $\Delta$*  (FC < 1). U inducirajućim uvjetima, razina ekspresije *FLO11* kod mutanta *taf14 $\Delta$*  ostaje na razini one u standardnim uvjetima, dok divlji tip aktivno eksprimira *FLO11* (prosječna vrijednost FC je veća od 3).



Slika 33. Grafički prikaz rezultata dobivenih metodom qPCR za gene koji sudjeluju u filamentaciji. Uvjeti uzgoja su opisani u tekstu. Promatrana je relativna ekspresija gena kod divljeg tipa i mutanta *taf14Δ* u standardnim uvjetima (uzgoj u bogatom mediju YPD, crne oznake na grafu) i u uvjetima inducirane filamentacije (uzgoj u mediju YP s 0,1 % glukoze; crvene oznake na grafu) u trajanju od 90 minuta. Rezultati umnažanja su obrađeni metodom  $\Delta C_t$ , a vrijednosti su normalizirane prema vrijednostima za referentni gen *ACT1*, te je na grafu prikazana relativna ekspresija, odnosno FC (engl. *fold change*);  $FC = 2^{-\Delta C_t}$ . Za svaki konstrukt kvasca *S. cerevisiae* prikazana su po dva podatka koji predstavljaju dva neovisna uzgoja, a vrijednosti su aritmetičke sredine dva tehnička replikata.

## **4. RASPRAVA**



Protein Taf14 je podjedinica transkripcijskih faktora, sudjeluje u preinaci kromatina te djeluje kao čitač posttranslacijskih modifikacija. Njegov izostanak iz ovih kompleksa u kojima nije katalitička podjedinica, dovodi do destabilizacije navedenih kompleksa (Chen *et al.*, 2020). Radi se o proteinu koji, temeljem do danas poznatih podataka, može imati širok spektar uloga. Ovim istraživanjem pokušali smo odrediti ima li protein Taf14, obzirom na povezanost s više komponenti transkripcije, ulogu u odgovoru stanice na stres stanične stijenke i pokretanje filamentacije. Dobiveni rezultati pokazuju moguću posrednu ulogu proteina Taf14 u odgovoru stanice na izlaganje stresu stanične stijenke i u nekim oblicima filamentacije.

Istraživanje smo počeli fenotipskom karakterizacijom proteina Taf14 u patogenoj gljivici *C. albicans* i kvascu *S. cerevisiae*, ispitivanjem otpornosti i osjetljivosti mutanta *TAF14* na različite temperature i tvari koje dovode do oštećenja DNA, stresa stanične membrane i stanične stijenke, osmotskog i oksidativnog stresa. Dobiveni rezultati (poglavlje 3.1.) potvrdili su prethodna istraživanja kad je riječ o osjetljivosti mutanta *TAF14* kod *S. cerevisiae* na povišene temperature, oštećenje DNA, osmotski i oksidativni stres te tvari koje djeluju na staničnu membranu (Shanle *et al.*, 2015; Peil *et al.*, 2020). Zanimljiv rezultat, koji je i usmjerio daljnja istraživanja, dobiven je kod ispitivanja rasta ovih kvasaca na tvari koje djeluju na staničnu stijenku. Sojevi oba kvasca izloženi su stresu stanične stijenke tako što su u standardne hranjive podloge dodane tvari Congo Red (boja koja se koristi u industriji, istraživanjima i kao indikator vrijednosti pH, a djeluje na staničnu stijenku tvoreći komplekse s mrežom strukturnih glikana (Kopecka i Gabriel, 1992)) ili Calcofluor White (boja koja se veže na hitine iz stanične stijenke). Izloženi stresu stanične stijenke, kod mutanta *TAF14* kvasca *S. cerevisiae* dolazi do potpunog izostanka rasta, dok je mutant *TAF14* kod *C. albicans* bio otporan na ovaj stres i na koncentracijama na kojima je došlo do izostanka rasta divljeg tipa. Dakle, izostanak *TAF14* čini kvasac *S. cerevisiae* osjetljivim na izlaganje stresu stanične stijenke, dok gljivicu *C. albicans* čini otpornom na ovakav stres odnosno daje neku vrstu prednosti u ovim uvjetima. Suradna istraživačka skupina sa Sveučilišta Monash je nastavila istraživati ovaj fenotip kod *C. albicans* (Wang *et al.*, 2020), a naša grupa pri Institutu Ruđer Bošković usmjerila se na istraživanja na kvascu *S. cerevisiae* koja su dio ove disertacije. Promatrali smo ulogu Taf14 kod kvasca *S. cerevisiae* u održavanju stanične stijenke, a potom i u filamentaciji, u svjetlu činjenice da je patogenim pripadnicima ove skupine upravo prilagodba stanične stijenke i filamentacija jedan od ključnih mehanizama za virulentnost.

## Protein Taf14 i stres stanične stijenke

Detaljna analiza ekspresijskog odgovora kvasca na stres stanične stijenke izazvan izlaganjem tvari Calcofluor White koja se veže na strukturne  $\beta$ -glukane stijenke provedena je metodom RNAseq. Dobiveni rezultati diferencijalne ekspresije su potom filtrirani i analizirani te podvrgnuti analizi na platformi STRING (poveznice na sve rezultate su u tablici P1.) koja omogućava analizu obogaćenja pojmovima i kategorijama iz nekoliko poznatih baza podataka (GO, KEGG, STRING klasteri...) uz vizualizaciju rezultata.

Stanice kvasca izložene stresu stanične stijenke izlaganjem tvari Calcofluor White očekivano pokazuju smanjenu ekspresiju gena uključenih u sintezu aminokiselina i proteina. Jasno je da štedljiva i pragmatična stanica u nepovoljnim uvjetima neće usmjeriti resurse u stvaranje novih proteina i ovo je vidljivo kod divljeg tipa (tablica 9., KEGG analiza obogaćenja) i kod mutanta *taf14 $\Delta\Delta$*  (tablica 10., KEGG analiza obogaćenja). Kod divljeg tipa pri izlaganju stresu stanične stijenke dolazi do povećane ekspresije gena uključenih u više metaboličkih puteva, metabolizam glukoze i škroba, ciklus TCA, dakle redom mehanizama kojima se koristi pohranjena energija za suočavanje s nepovoljnim uvjetima, te dolazi do aktivacije signalnih puteva MAPK (tablica 8., KEGG analiza obogaćenja). Zanimljivo je da je sličan utjecaj na ekspresijski profil vidljiv i kad uspoređujemo divlji tip i mutant *taf14 $\Delta\Delta$*  u standardnim uvjetima (tablica 7., KEGG analiza obogaćenja). Dakle već sam izostanak *TAF14* predstavlja neku vrstu stresa za stanicu sudeći po tome da je kod mutanta *taf14 $\Delta\Delta$*  povećana ekspresija gena uključenih u metabolizam šećera, ciklus TCA, glioksilatni ciklus, oksidativnu fosforilaciju i razne metaboličke puteve.

Usredotočimo li se na puteve povezane sa staničnom stijenkom, primijetit ćemo da prema analizi obogaćenja prema GO biološkom procesu, i kod divljeg tipa i kod mutanta *taf14 $\Delta\Delta$*  nakon izlaganja stresu stanične stijenke, očekivano dolazi do smanjene ekspresije gena uključenih u organizaciju stanične stijenke (poveznice u tablici P1.). Nadalje, uspoređujući rezultate našeg istraživanja s podacima iz literature izdvojili smo članak grupe Klis (Boorsma *et al.*, 2004) u kojem je provedena globalna analiza transkriptoma kvasca pri stresu stanične stijenke izazvanog tretmanom tvari Calcofluor White. Autori ovog članka istaknuli su četiri skupine gena kojima se ekspresija povećava pri stresu stanične stijenke (geni za održavanje stanične stijenke, geni uključeni u opći stanični stres, geni ostalih funkcija i geni nepoznatih funkcija). U Tablici P2. napravljena je informativna usporedba naših rezultata i rezultata grupe

Klis koja pokazuje da je u našem istraživanju došlo do očekivanog porasta ekspresije navedenih gena i kod divljeg tipa i kod mutanta *taf14ΔΔ*. Važno je napomenuti da u ovoj usporedbi rezultata ne možemo uspoređivati apsolutne vrijednosti jer se radi o različitim metodama i uvjetima uzgoja (Boorsma i suradnici koristili su nižu dozu CFW za tretman svojih sojeva), ali jasno je da dolazi do aktivacije ovih gena. Međutim, među našim rezultatima se ističe razina povećanja ekspresije kod skupine gena uključenih u odgovor na opći stanični stres (geni *PNC1*, *GPD1*, *HSP12*, *DDR48*) koja je u mutanta *taf14ΔΔ* bar dvostruko manja nego u divljeg tipa.

Nadalje, promatramo li gene za proteine uključene u signalni put CWI, podaci o diferencijalnoj ekspresiji ne pokazuju značajnu razliku kod signalnih komponenti puta CWI poput gena za *WSC1*, *MID2*, *MTL1*; *ROM1/2*; *PKC1*, *BCK1* (detaljnje opisani u poglavlju 1.4.1). Kinaze Slt2 i Msg5 pojačano se i u istoj mjeri eksprimiraju nakon inducirano stresa (u odnosu na standardne uvjete) i kod divljeg tipa i kod mutanta (FC = 2,3 za divlji tip, odnosno 2,5 za mutant za gen *SLT2*; i FC ~ 2,1 kod oba soja za gen *MSG5*). Očekivano, podaci o diferencijalnoj ekspresiji pokazuju povećanu ekspresiju Rho1 kod divljeg tipa nakon izlaganju stresu stanične stijenke što potvrđuje da je došlo do izazivanja željenih eksperimentalnih uvjeta. Podaci o ekspresiji *RHO1* kod mutanta Taf14 nisu prošli filtere obrade, ali detaljnijim pregledom podataka, jasno je da nema značajnih razlika.

Rezultati diferencijalne ekspresije gena kada uspoređujemo divlji tip i mutant pri izlaganju stresu stanične stijenke, pokazuju da je manoprotein stanične stijenke Tir1 značajno slabije eksprimiran (FC = -4,15) u odsustvu proteina Taf14. Protein Tir1 pripada skupini GPI-usidrenih proteina stanične stijenke i prvotno je identificiran kao protein specifičan za stanične kulture (Kitagaki *et al.*, 1997), a važan je za tranziciju faze S u G2 staničnog ciklusa (Caro *et al.*, 1998). Danas je poznato da njegova ekspresija raste u anaerobnim uvjetima i pri izlaganju niskim temperaturama (Abramova *et al.*, 2001; Klis *et al.*, 2002), a nagađa se da stvara mostove između  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,6-glukana (Levin, 2011). Također, u ovom setu diferencijalno eksprimiranih gena izdvaja se i gen za protein Clb1 koji je značajno manje eksprimiran kod mutanta Taf14 (FC = -2,69). Radi se o ciklinu B-tipa koji je uključen u progresiju kroz stanični ciklus. Njegova uloga nije sasvim razjašnjena, ali pokazano je da se pojavljuje u kasnoj S fazi, najviše ga je tijekom mitoze te se pri izlazu iz mitoze razgrađuje. Pretpostavlja se da ima specifičnu ulogu koja inhibira procese koji dovode do progresije u sljedeći stanični ciklus (Tzeng *et al.*, 2011). Ovi rezultati mogu se uklopiti i u zapažanja koja smo dobili protočnom citometrijom (poglavljje 3.2.1.) kada je promatran oporavak sojeva nakon izlaganja stresu stanične stijenke, odnosno

nastavak progresije kroz stanični ciklus. Ovdje je primijećeno da većina stanica mutanta Taf14 ne napreduje kroz stanični ciklus nakon stresa stanične stijenke i zaostaje u G1 fazi barem dva sata. Zanimljivo je da baza podataka o genomu kvasaca (engl. *Saccharomyces Genome Database*; SGD) navodi da postoje tri regulatora TAF14: SFP1, SRB5 i TFC7. Slijed koji kodira za SRB5 nalazi se na kromosomu VII (chrVII:698368..697445) u blizini gena CLB1 (chrVII:703636..705051). Protein Srb5 dio je kompleksa Medijator i sudjeluje u regulaciji transkripcije. U kontekstu odgovora na stres stanične stijenke, Taf14 vjerojatno nema direktnu ulogu u glavnim putevima održavanja integriteta stanične stijenke, ali postoji mogućnost da sudjeluje na drugim razinama. Kako je prethodno spomenuto, stanica suočena s izazovima aktivira brojne signalne puteve koji pomažu u prevladavanju i održavanju homeostaze. Jedna od mogućnosti je da Taf14 ima posrednu ulogu u kontroli ili zaustavljanju napredovanja kroz stanični ciklus ili ponovnom pokretanju ciklusa nakon prevladavanja stresa.

### **Protein Taf14 i filamentacija**

Filamentacija je jedna od karakteristika koje vežemo za virulentnost patogenih gljivica (Lo *et al.*, 1997). Upravo ova sposobnost omogućuje gljivicama poput *C. albicans*, *C. glabrata* i drugih da se invazivno prošire tkivom ili krvi domaćina ili da formiraju biofilmove na plastici poput one od koje su građeni kateteri. Prema podacima američkog javno-zdravstvenog servisa CDC (engl. *Centers for disease control and prevention*), procjenjuje se da oko 25 % bolničkih invazivnih kandidijaza završava smrtnim ishodom [2].

U ovom radu ispitali smo i utječe li protein Taf14 na sposobnost različitih vrsta filamentacije kod modelnog kvasca *S. cerevisiae*. Korišten je *S. cerevisiae* soja  $\Sigma$ 1278 na kojem su napravljena pionirska istraživanja koja su pokazala kako i ovi kvasci mogu filamentirati (Gimeno *et al.*, 1992) te i danas služe kao pouzdani modeli za proučavanje mehanizama povezanih s patogenim djelovanjem. Osnovna razlika filamentacije *C. albicans* i *S. cerevisiae* je u tome što kod modelnog kvasca ne dolazi do potpunog odvajanja stanične stijenke nakon izduživanja pa se negdje govori i o pseudofilamentaciji. Također, ovaj mehanizam modelnom kvascu predstavlja način preživljavanja i načelno ne dovodi do posljedica za domaćina poput infekcija. Ključni elementi filamentacije - širenje podlogom, prijanjanje u podlogu i formiranje biofilma, ispitali su u kontekstu uloge Taf14 i njegove funkcije čitača posttranslacijskih modifikacija.

Širenje podlogom odnosno stvaranje karakterističnih oblika (na podlogama s 0,3 % agara, u testu formiranja tepiha) za soj  $\Sigma 1278$  nije izravno ovisno o Taf14 niti o njegovoj funkciji čitača acilacija. Ipak, obzirom da je radijus širenja po podlozi na razini onoga kod mutanta *FLO11*, ostaje mogućnost da postoji posredna uloga u ovom procesu ili je, inače blago sporiji rast mutanta *TAF14* dodatno opterećen iscrpljivanjem podloge zbog dugotrajnog uzgoja. Nadalje, sposobnost kvasca za prodiranje u podlogu ali ne i površinsku adheziju, čini se, ovisi o proteinu Taf14 te za ovu ulogu nije važna njegova sposobnost čitanja acilacija.

Izazvani ograničenim izvorima dušika i ugljika, u ovom istraživanju, kvasci koji nemaju uputu za Taf14 pokazuju fenotipove koji se razlikuju od divljeg tipa. Na prikazima rezultata SLAD testa kojim se promatra stvaranje razgranatih filamenata u uvjetima ograničenih izvora dušika, vidljivo je da mutant *taf14Δ* ima okrugle zrnate strukture, te da izostaje formiranje izduženih niti. Konstrukt s vektorskom uputom za *TAF14* s točkastom mutacijom koja onemogućuje čitanje acilacija, pokazuje jako smanjeno područje širenja, ali se jasno vide nitaste strukture.

Formiranje biofilma na polistirenu potaknuto je oskudnim izvorom glukoze (20 puta manje u odnosu na standardnih 2 % w/V glukoze), te se pokazalo težim za sojeve koji ne mogu eksprimirati Taf14. Razina stvorenog biofilma mutanta *taf14Δ* bila je 60 % manja od razine očitane za divlji tip kada su stanice rasle s oskudnim izvorom glukoze (0,1 %) te u ovakvim uvjetima vidimo i najveću razliku između divljeg tipa i mutanta *taf14Δ*. Također, između dva komplementacijska konstrukta se vidi razlika u razini formiranog biofilma koja je najizraženija nakon uzgoja s 1 % glukoze, a ukazuje da komplement koji ne čita acilacije stvara manje biofilmova. Treba imati na umu da ova metoda ima i svoja ograničenja od kojih je jedna i činjenica da se kvasci uzgajaju u mikrotitarskim pločicama (sa slabijom aeracijom) pa nisu izazvani jedino manjkom izvora glukoze.

Nadalje, analizom ekspresije gena u uvjetima koji potiču filamentaciju (u uvjetima smanjenog izvora glukoze), nismo vidjeli bitne razlike u ekspresiji gena *TEC1*, *SNF1* i *MFG1* kod divljeg tipa i mutanta što pokazuje da nije došlo do pokretanja kaskadnih puteva preko ovih gena ili da uvjeti nisu bili pogodni za njihovu aktivaciju. Sljedeća istraživanja mogla bi istražiti i ekspresiju nakon kraćeg i duljeg izlaganja inducirajućim uvjetima i razjasniti dolazi li i kada do aktivacije ostalih važnih gena za filamentaciju.

Ipak, u istim eksperimentalnim uvjetima, uočeno je da se ekspresija gena *FLO11*, ključnog gena koji regulira filamentaciju, aktivira u divljem tipu, dok u mutantu *taf14Δ* ekspresija *FLO11*

ostaje na razini kao u neinduciranim uvjetima. Dakle, u odsutnosti *TAF14* dolazi do izostanka aktivacije *FLO11*, ali se ono ne reflektira na razine ekspresije nekih od uobičajnih regulatora *FLO11* (Tec1, Snf1 i Mgf1, detaljnije opisani u poglavlju 1.5.). U kvascu i drugim gljivama, Flo11 je potreban za procese filamentacije i širenja podlogom te prijanjanje na podlogu (Reynolds i Fink, 2001), a novije istraživanje pokazuje i da je filamentacija kod kvasca pod regulacijom poznatog kompleksa za preinaku kromatina SAGA (Chow *et al.*, 2019). Povezanost kompleksa SAGA s filamentacijom otvara mogućnost da je uloga Taf14 u filamentaciji možda povezana sa stabilizacijom ili regrutacijom ovog kompleksa koji je uključen u vezanje transkripcijskih aktivatora, vezanje TBP-a te acetilaciju i deubikvitinaciju histona (Donczew *et al.*, 2020).

Dakle, prema rezultatima ovog istraživanja, filamentacija može biti jedan od procesa u kojem sudjeluje protein Taf14. Pokazali smo da sojevi koji ne ekspimiraju Taf14, u standardnim uvjetima (bez indukcije stresa) normalno stvaraju rebraste i zrakaste strukture te lagano prijanjaju na površinu. Međutim, u odsustvu Taf14, stanice ne prodiru u agar, djelomično izostaju i karakteristične zrakaste i rebraste strukture, a pri indukciji filamentacije ne dolazi do povećanja ekspresije ključnog regulatora Flo11. Slijedom navedenog, čini se da je povezanost Taf14 i Flo11 izraženija u uvjetima stresa kada su izvori nutrijenata ograničeni, a na budućim je istraživanjima otkriti detalje ove uloge.

Rezultati istraživanja proteina Taf14 u transkripcijskim kompleksima TFIID i TFIIF (Peil *et al.*, 2020) navode na zaključak da mehanizam stabilizacije i prepoznavanja posttranslacijskih modifikacija koji vjerojatno vrši Taf14, predstavlja dodatni mehanizam u odgovoru stanice na izazove iz okoliša obzirom da je Taf14 podjedinica koju ovi kompleksi sadrže kod kvasca, ali njegove izravne funkcionalne inačice ne nalazimo u ovim kompleksima kod ljudi. Također, moguće je da su uloge proteina Taf14 više povezane s njegovim C-terminusom nego s bolje istraženom domenom YEATS (Peil *et al.*, 2020). Prethodna istraživanja i naše istraživačke grupe pokazala su da je za interakciju Taf14 s poznatim podjedinicama ključan upravo C-terminus, odnosno da već uklanjanjem 20 aminokiselina s C-terminusa dolazi do izostanka ovih interakcija (diplomski rad, neobjavljeni podaci). Na tragu toga, bilo bi vrijedno provjeriti i moguću ulogu same C-terminalne domene i YEATS-domene proteina Taf14, kako u ostalim procesima, tako i u održavanju stanične stijenke i u filamentaciji.

Nadalje, istraživanja provedena na kompleksu TFIID, odnosno njegovoj podjedinici Taf2, otkrila su varijantu Taf2 (Taf2- $\Delta$ C) koja se *in vitro* i *in vivo* stabilno ugrađuje u kompleks kao i divlji tip, ali ne dolazi do interakcije s Taf14. Ova varijanta (koju autori nazivaju varijantom razdvojene funkcije; engl. *separation-of-function variant*) omogućuje proučavanje stabilnog kompleksa TFIID u odsutnosti Taf14, ali i bez utjecaja na druge komplekse kojima je Taf14 podjedinica (Feigerle i Weil, 2016). Detalji uloge Taf14 nisu razjašnjeni ni ovim istraživanjem ali je predložena mogućnost da Taf14 služi regrutiranju TFIID na promotore aktivnih gena tako što stvara dodatne interakcije između promotora i kompleksa TFIID, te da domena YEATS proteina Taf14 svojom interakcijom s modificiranim kromatinom doprinosi funkciji TFIID. Isti autori upućuju i da je moguće, ako se pokaže da Taf14 može vezati više kompleksa istovremeno, da djeluje poput mosta između TFIID i TFIIF, važnih transkripcijskih faktora. Svakako, princip korišten u ovom istraživanju, gdje je postignuto razdvajanje više funkcija jednog proteina, bit će vrijedno koristiti za buduća istraživanja kako bi se dobila jasnija i točnija slika o ulozi proteina u pojedinom kompleksu.

Protein Taf14 ima, kako je i ranije opisano, ulogu čitača krotonilacije, posttranslacijske modifikacije koja je u fokus znanstvene zajednice došla posljednjih desetak godina (Tan *et al.*, 2011). Modifikacije kromatina predstavljaju brz i učinkovit način kako stanice odgovaraju na svoje i zahtjeve okoliša, stoga je jasno da razumijevanjem utjecaja okoliša na promjene kromatina i ekspresiju gena daje važne odgovore o održavanju homeostaze i objašnjavanje metaboličkih poremećaja (Gowans *et al.*, 2019). Modifikacija krotonilnom skupinom je, kao i acetilacija, općenito povezana s aktivnom transkripcijom (Tan *et al.*, 2011; Sabari *et al.*, 2017). Ipak, novija istraživanja, provedena na sustavu kvašćevog metaboličkog ciklusa (engl. *yeast metabolic cycle*, YMC), pokazala su neke razlike između krotonilacije i acetilacije. Ovaj sustav karakterizira ograničena razina glukoze koja oponaša one u prirodi, te sinkronizirani metabolički ciklusi visoke (HOC; engl. *high oxygen consumption*) i niske (LOC, engl. *low oxygen consumption*) konzumacije kisika. Tako se u ciklusu visoke razine konzumacije kisika odvijaju metabolički zahtjevniji procesi, povećana je razina acetilacije lizina u histonima i ekspresija gena koji potiču rast te ribosomskih podjedinica i komponenti uključenih u translaciju. Ovim pristupom uočeno je da se najviša razina krotonilacije javlja upravo na prijelazu iz faze HOC u LOC te da se razina acetilacije smanjuje kako se stanice vraćaju u fazu LOC. Odnosno, krotonilacija H3K9 je na najvišoj razini kad razina acetilacije opada i kad su razine nutrijenata ograničene. Sposobnost proteina Taf14 za čitanje krotonilacije na H3K9 pokazala se nužnom za točno napredovanje sustava YMC i za periodičnu represiju gena za rast

kada su stanice prelazile u fazu LOC, dakle Taf14 ovdje pokazuje ulogu negativnog regulatora ekspresije gena kada je stanica ograničena nutrijentima (Gowans *et al.*, 2020). Zanimljivo je da autori navode i kako je u nesinkroniziranim kulturama kvasaca koji su uzgajani u standardnom bogatom mediju uočena tek niska razina krotonilacije H3K9 što može objasniti rezultate iz ovog rada gdje nismo vidjeli izraženije fenotipove kada smo promatrali mutant Taf14 koji nije sposoban čitati krotonilacije. Buduća istraživanja proteina Taf14 mogli bismo usmjeriti na sinkronizirane kulture kvasaca i utjecaj egzogenog krotonata.

Istraživanja provedena na dobro poznatom i detaljno opisanom metabolizmu galaktoze dobar su primjer kako evolucijski konzervirani geni mogu imati potpuno različitu regulaciju kod srodnih organizama (Martchenko *et al.*, 2007). Grupa Malcolma Whitewaya opisala je na primjeru *GAL*-gena i pokretanja Leloir puta proces koji nazivaju engl. *rewiring* što bi u slobodnom prijevodu nazvali premrežavanje. Kod kvasca *S. cerevisiae* protein Gal4 kontrolira ekspresiju *GAL* gena dok njegov homolog u *C. albicans* nema tu ulogu. Kod patogene gljivice aktivacija *GAL* gena odvija se preko više puteva i vrši je Cph1 (homolog Ste12 *S. cerevisiae*). Autori naglašavaju i da je ovo možda rezultat uloge galaktoze u filamentacijskim procesima koji imaju drugačiji kontekst kod patogenih gljivica u odnosu na *S. cerevisiae*. Također, navode i da je kod ovakvih događaja moguće da transkripcijsku kontrolu vrše indermedijeri koji povezuju nove i stare regulatore. Protein Taf14, kako smo pokazali, ima različit fenotip pri izlaganju ispitivanom stresu stanične stijenke kod *C. albicans* i *S. cerevisiae* koji je možda rezultat ovakvog premrežavanja uloga.

Kvasac je evolucijski razvio brojne mehanizme prilagodbe na uvjete u okolišu, a ono što je važno kod prilagodbe novim uvjetima je aktivacija transkripcije potrebnih gena. Također, vjerojatno je da proces posttranslacijskih modifikacija kromatina acilacijom lizina povezuje metabolizam, stres i rast te prilagodbu stanice na nove uvjete u okolišu. Detaljna uloga i mehanizam djelovanja proteina Taf14 do danas nisu opisani, ali obzirom na brojne uloge u različitim kompleksima i potencijala da bude terapijska meta, za očekivati je da će biti predmetom budućih istraživanja.



## **5. ZAKLJUČCI**

- Izostanak proteina Taf14 čini kvasac *S. cerevisiae* osjetljivim na stres stanične stijenke izazvan tvarima Calcofluor White i Congo Red, dok u slučaju *C. albicans* dovodi do povećane otpornosti na ovu vrstu stresa.
- Izložene stresu stanične stijenke, stanice kvasca *S. cerevisiae* koje ne eksprimiraju Taf14 pokreću signalne puteve integriteta stanične stijenke, ali u manjoj mjeri nego divlji tip.
- U normalnim uvjetima, stanice bez upute za Taf14 pokazuju povećanu ekspresiju gena uključenih u metabolizam šećera, oksidativnu fosforilaciju i razne metaboličke puteve.
- Ekspresijski profil stanica *S. cerevisiae* koje nemaju uputu za Taf14 i izložene su stresu pokazuje slabiju aktivaciju skupine gena koji su povezani s općim odgovorom stanice na stres.
- U normalnim uvjetima (bez dodatnog izazivanja filamentacije), stanice kvasca koje nemaju Taf14 slabije se šire podlogom naspram divljeg tipa, pokazuju slabiju adheziju na podlogu i izostanak invazije u podlogu.
- U uvjetima ograničenog izvora dušika koji potiče filamentaciju, stanice kvasca koje nemaju uputu za Taf14 ne pokazuju karakteristično izduživanje i grananje lanaca kolonija.
- Izlaganje oskudnim izvorima glukoze kod divljeg tipa kvasca pokreće aktivaciju gena *FLO11* za regulaciju filamentacije, dok ista kod mutanta *TAF14* ostaje na razini normalnih uvjeta.

## **6. LITERATURA**

- Abramova, N., Sertil, O., Mehta, S., & Lowry, C. V. (2001). Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 183(9), 2881–2887. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2881-2887.2001>
- Aguilar-Uscanga, B., & François, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology*, 37(3), 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01394.x>
- Andrews, F. H., Shanle, E. K., Strahl, B. D., & Kutateladze, T. G. (2016). The essential role of acetyllysine binding by the YEATS domain in transcriptional regulation. *Transcription*, 7(1), 14–20. <https://doi.org/10.1080/21541264.2015.1125987>
- Andrews, F. H., Shinsky, S. A., Shanle, E. K., Bridgers, J. B., Gest, A., Tsun, I. K., Krajewski, K., Shi, X., Strahl, B. D., & 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>
- Berman J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.007>
- Bourbon H. M. (2008). Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic acids research*, 36(12), 3993–4008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn349>
- Braus, G. H., Grundmann, O., Brückner, S., & Mösch, H. U. (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 14(10), 4272–4284. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-01-0042>
- Bumgarner, S. L., Dowell, R. D., Grisafi, P., Gifford, D. K., & Fink, G. R. (2009). Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18321–18326. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909641106>
- Cairns, B. R., Henry, N. L., & Kornberg, R. D. (1996). TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Molecular and cellular biology*, 16(7), 3308–3316. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.7.3308>
- Caro, L. H., Smits, G. J., van Egmond, P., Chapman, J. W., & Klis, F. M. (1998). Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS microbiology letters*, 161(2), 345–349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12967.x>
- Chaffin W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 72(3), 495–544. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00032-07>

- Chen, G., Wang, D., Wu, B., Yan, F., Xue, H., Wang, Q., Quan, S., & 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>
- Chen, R. E., & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1311–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>
- Chen, R. E., & Thorner, J. (2010). Systematic epistasis analysis of the contributions of protein kinase A- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling to nutrient limitation-evoked responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 185(3), 855–870. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.115808>
- Chow, J., Starr, I., Jamalzadeh, S., Muniz, O., Kumar, A., Gokcumen, O., Ferkey, D. M., & Cullen, P. J. (2019). Filamentation Regulatory Pathways Control Adhesion-Dependent Surface Responses in Yeast. *Genetics*, 212(3), 667–690. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302004>
- Côté, J., Quinn, J., Workman, J. L., & Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5168), 53–60. <https://doi.org/10.1126/science.8016655>
- Cullen P. J. (2015). Investigating filamentous growth and biofilm/mat formation in budding yeast. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(3), 235–238. <https://doi.org/10.1101/pdb.top077495>
- Cullen, P. J., & Sprague, G. F., Jr (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13619–13624. <https://doi.org/10.1073/pnas.240345197>
- Cullen, P. J., & Sprague, G. F., Jr (2012). The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics*, 190(1), 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>
- Dawes, I. W., & Perrone, G. G. (2020). Stress and ageing in yeast. *FEMS yeast research*, 20(1), foz085. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz085>
- d'Enfert C. (2009). Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Current opinion in microbiology*, 12(4), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.008>
- Donczew, R., & Hahn, S. (2017). Mechanistic Differences in Transcription Initiation at TATA-Less and TATA-Containing Promoters. *Molecular and cellular biology*, 38(1), e00448-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00448-17>

- Donczew, R., Warfield, L., Pacheco, D., Erijman, A., & Hahn, S. (2020). Two roles for the yeast transcription coactivator SAGA and a set of genes redundantly regulated by TFIID and SAGA. *eLife*, 9, e50109. <https://doi.org/10.7554/eLife.50109>
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., & Côté, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology*, 24(5), 1884–1896. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.5.1884-1896.2004>
- Erlich, R. L., Fry, R. C., Begley, T. J., Dae, D. L., Lahue, R. S., & Samson, L. D. (2008). Anc1, a protein associated with multiple transcription complexes, is involved in postreplication repair pathway in *S. cerevisiae*. *PloS one*, 3(11), e3717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003717>
- Free S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in genetics*, 81, 33–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in microbiology*, 10, 2993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6), 1077–1090. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90079-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90079-r)
- Gow, N. A., & Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current opinion in microbiology*, 15(4), 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.005>
- Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3), 705–736. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127019>
- Han, Y., Luo, J., Ranish, J., & Hahn, S. (2014). Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA transcription coactivator complex. *The EMBO journal*, 33(21), 2534–2546. <https://doi.org/10.15252/emboj.201488638>
- Harkins, H. A., Pagé, N., Schenkman, L. R., De Virgilio, C., Shaw, S., Bussey, H., & Pringle, J. R. (2001). Bud8p and Bud9p, proteins that may mark the sites for bipolar budding in yeast. *Molecular biology of the cell*, 12(8), 2497–2518. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2497>
- Huisinga, K. L., & Pugh, B. F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*, 13(4), 573–585. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00087-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00087-5)

- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Sellers-Moya, Á., Molina, M., & Martín, H. (2020). Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 23(1), 107–119. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00092-2>
- Jung, U. S., & Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Molecular microbiology*, 34(5), 1049–1057. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01667.x>
- Kabani, M., Michot, K., Boschiero, C., & Werner, M. (2005). Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(2), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.158>
- Kitagaki, H., Shimoi, H., & Itoh, K. (1997). Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry*, 249(1), 343–349. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00343.x>
- Klein, B. J., Vann, K. R., Andrews, F. H., Wang, W. W., Zhang, J., Zhang, Y., Beloglazkina, A. A., Mi, W., Li, Y., Li, H., Shi, X., Kutateladze, A. G., Strahl, B. D., Liu, W. R., & Kutateladze, T. G. (2018). Structural insights into the  $\pi$ - $\pi$ - $\pi$  stacking mechanism and DNA-binding activity of the YEATS domain. *Nature communications*, 9(1), 4574. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07072-6>
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 23(3), 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Kono, K., Nogami, S., Abe, M., Nishizawa, M., Morishita, S., Pellman, D., & Ohya, Y. (2008). G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 19(4), 1763–1771. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-09-0950>
- Kopecká, M., & Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1---3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology*, 158(2), 115–126. <https://doi.org/10.1007/BF00245214>
- Lamb, T. M., & Mitchell, A. P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 23(2), 677–686. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.2.677-686.2003>
- Latgé J. P. (2010). Tasting the fungal cell wall. *Cellular microbiology*, 12(7), 863–872. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x>

- Lee, J. C., Tsoi, A., Kornfeld, G. D., & Dawes, I. W. (2013). Cellular responses to L-serine in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of general amino acid control, compartmentalization, and aspartate synthesis. *FEMS yeast research*, 13(7), 618–634. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12063>
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics*, 34, 77–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.77>
- Lenardon, M. D., Sood, P., Dorfmüller, H. C., Brown, A., & Gow, N. (2020). Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. *Cell surface* (Amsterdam, Netherlands), 6, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2020.100047>
- Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 70(2), 317–343. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-05>
- Levin D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 189(4), 1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S. Y., Li, W., Li, H., & Shi, X. (2014). AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*, 159(3), 558–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.049>
- Liu, G., Zheng, X., Guan, H., Cao, Y., Qu, H., Kang, J., Ren, X., Lei, J., Dong, M. Q., Li, X., & Li, H. (2019). Architecture of *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Cell discovery*, 5, 25. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0094-x>
- Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939–949. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80358-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80358-x)
- Martchenko, M., Levitin, A., Hogues, H., Nantel, A., & Whiteway, M. (2007). Transcriptional rewiring of fungal galactose-metabolism circuitry. *Current biology* : CB, 17(12), 1007–1013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.017>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Merzendorfer, H., & Heinisch, J. J. (2013). Microcompartments within the yeast plasma membrane. *Biological chemistry*, 394(2), 189–202. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0241>



- Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J., Bulawa, C. E., & Gow, N. A. (2001). Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Molecular microbiology*, 39(5), 1414–1426. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02347.x>
- Nather, K., & Munro, C. A. (2008). Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS microbiology letters*, 285(2), 137–145. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01263.x>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual review of microbiology*, 69, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V., & Johnson, A. D. (2010). Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature genetics*, 42(7), 590–598. <https://doi.org/10.1038/ng.605>
- Nogales, E., Louder, R. K., & He, Y. (2017). Structural Insights into the Eukaryotic Transcription Initiation Machinery. *Annual review of biophysics*, 46, 59–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033751>
- Orlean P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3), 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Papai, G., Frechard, A., Kolesnikova, O., Crucifix, C., Schultz, P., & Ben-Shem, A. (2020). Structure of SAGA and mechanism of TBP deposition on gene promoters. *Nature*, 577(7792), 711–716. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1944-2>
- Park, H. O., & Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 71(1), 48–96. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-06>
- Patel, A. B., Louder, R. K., Greber, B. J., Grünberg, S., Luo, J., Fang, J., Liu, Y., Ranish, J., Hahn, S., & Nogales, E. (2018). Structure of human TFIID and mechanism of TBP loading onto promoter DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6421), eaau8872. <https://doi.org/10.1126/science.aau8872>
- Peil, K., Jürgens, H., Luige, J., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2020). Taf14 is required for the stabilization of transcription pre-initiation complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Epigenetics & chromatin*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00347-7>
- Philip, B., & Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and cellular biology*, 21(1), 271–280. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.271-280.2001>

- Reynolds, T. B., & Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5505), 878–881. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878>
- Rhee, H. S., & Pugh, B. F. (2012). Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*, 483(7389), 295–301. <https://doi.org/10.1038/nature10799>
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H., & Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *The EMBO journal*, 18(5), 1257–1269. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1257>
- Sabari, B. R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H. E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J. R., Zhao, Y., Roeder, R. G., & Allis, C. D. (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Molecular cell*, 58(2), 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.029>
- Schier, A. C., & Taatjes, D. J. (2020). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes & development*, 34(7-8), 465–488. <https://doi.org/10.1101/gad.335679.119>
- Schulze, J. M., Kane, C. M., & Ruiz-Manzano, A. (2010). The YEATS domain of Taf14 in *Saccharomyces cerevisiae* has a negative impact on cell growth. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 283(4), 365–380. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0523-x>
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., & Kobor, M. S. (2009). YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 87(1), 65–75. <https://doi.org/10.1139/O08-111>
- Selmecki, A., Forche, A., & Berman, J. (2010). Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 9(7), 991–1008. <https://doi.org/10.1128/EC.00060-10>
- Setiaputra, D., Ahmad, S., Dalwadi, U., Steunou, A. L., Lu, S., Ross, J. D., Dong, M. Q., Côté, J., & Yip, C. K. (2018). Molecular Architecture of the Essential Yeast Histone Acetyltransferase Complex NuA4 Redefines Its Multimodularity. *Molecular and cellular biology*, 38(9), e00570-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00570-17>
- Shanle, E. K., Andrews, F. H., Meriesh, H., McDaniel, S. L., Dronamraju, R., DiFiore, J. V., Jha, D., Wozniak, G. G., Bridgers, J. B., Kerschner, J. L., Krajewski, K., Martín, G. M., Morrison, A. J., Kutateladze, T. G., & Strahl, B. D. (2015). Association of Taf14 with acetylated histone H3 directs gene transcription and the DNA damage response. *Genes & development*, 29(17), 1795–1800. <https://doi.org/10.1101/gad.269977.115>
- Smale, S. T., & Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry*, 72, 449–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>

Soutourina J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 262–274. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.115>

Stern, M., Jensen, R., & Herskowitz, I. (1984). Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *Journal of molecular biology*, 178(4), 853–868. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90315-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90315-2)

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>

Traven, A., Jelcic, B., & Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO reports*, 7(5), 496–499. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400679>

Tzeng, Y. W., Huang, J. N., Schuyler, S. C., Wu, C. H., & Juang, Y. L. (2011). Functions of the mitotic B-type cyclins CLB1, CLB2, and CLB3 at mitotic exit antagonized by the CDC14 phosphatase. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 48(10), 966–978. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.07.001>

van Dyk, D., Pretorius, I. S., & Bauer, F. F. (2005). Mss11p is a central element of the regulatory network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 169(1), 91–106. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.033704>

Vandermeulen, M. D., & Cullen, P. J. (2020). New Aspects of Invasive Growth Regulation Identified by Functional Profiling of MAPK Pathway Targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 216(1), 95–116. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303369>

Vyas, V. K., Kuchin, S., Berkey, C. D., & Carlson, M. (2003). Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Molecular and cellular biology*, 23(4), 1341–1348. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.4.1341-1348.2003>

Wang, H., Dienemann, C., Stützer, A., Urlaub, H., Cheung, A., & Cramer, P. (2020). Structure of the transcription coactivator SAGA. *Nature*, 577(7792), 717–720. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1933-5>

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., & Traven, A. (2020). The YEATS Domain Histone Crotonylation Readers Control Virulence-Related Biology of a Major Human Pathogen. *Cell reports*, 31(3), 107528. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107528>

Welch, M. D., & Drubin, D. G. (1994). A nuclear protein with sequence similarity to proteins implicated in human acute leukemias is important for cellular morphogenesis and actin cytoskeletal function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 5(6), 617–632. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.6.617>

Welch, M. D., Vinh, D. B., Okamura, H. H., & Drubin, D. G. (1993). Screens for extragenic mutations that fail to complement act1 alleles identify genes that are important for actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 135(2), 265–274.

Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J., & Cairns, B. R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Molecular and cellular biology*, 24(21), 9424–9436. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9424-9436.2004>

Zhang, W., Zhang, J., Zhang, X., Xu, C., & Tu, X. (2011). Solution structure of the Taf14 YEATS domain and its roles in cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 436(1), 83–90. <https://doi.org/10.1042/BJ20110004>

#### **Web izvori:**

[1]

<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/lysing-enzymes.html>

[2]

<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html>

## **7. SAŽETAK**

Obitelj proteina s domenom YEATS kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* čine proteini Taf14, Yaf9 i Sas5, kod gljivice *Candida albicans* Taf14 i Yaf9, a kod čovjeka GAS41, AF9 i ENL. Karakteristična domena YEATS nalazi se na N-terminusu proteina, sadrži oko 80 aminokiselina i važna je za funkciju "čitanja" posttranslacijskih modifikacija histona. Poznato je da protein Taf14 stupa u fizičku interakciju s više kompleksa u stanici i sudjeluje u transkripciji (kao dio općih transkripcijskih faktora TFIID i TFIIF te u kompleksu Medijator), preinaci kromatina (kompleksi INO80, RSC, SWI/SNF) i modifikaciji histona (kompleks acetiltransferaze NuA3). Uloga Taf14 u navedenim procesima nije katalitička te vjerojatno doprinosi stabilizaciji i sklapanju kompleksa.

Transkripcija gena posredovana RNA polimerazom II je, iako složen, evolucijski očuvan proces kod eukariota kojim nastaju svi stanični proteini. Precizna regulacija sinteze glasničke RNA (mRNA) jedan je od ključnih procesa koji utječu na staničnu diobu, diferencijaciju, rast, metabolizam te odgovor na promjene i izazove iz okoliša. Za učinkovitu transkripciju potrebno je genetički materijal pakiran u kromatin učiniti dostupnim transkripcijskoj mašineriji te omogućiti formiranje predinicijacijskog kompleksa. Obzirom da protein Taf14 sudjeluje u prepoznavanju i preinaci kromatina, te je podjedinica komponenti predinicijacijskog kompleksa, u ovom radu je ispitana njegova uloga u odgovoru stanice na stres stanične stijenke i proces filamentacije. Navedeni procesi su važni i u kontekstu razumijevanja patogenih pripadnika *Fungi*, poput *C. albicans*, kojima je filamentacija jedan od ključnih faktora za virulenciju, a djelovanje na integritet stanične stijenke patogena jedan je od najčešćih terapijskih pristupa u liječenju kandidijaza.

Fenotipske analize provedene na kvascu *S. cerevisiae* i gljivici *C. albicans* pokazale su da odsustvo proteina Taf14 čini kvasac osjetljivim na stres stanične stijenke (izazavan tvarima Congo Red i Calcofluor White), dok gljivici *C. albicans*, u istim uvjetima, predstavlja prednost te mutant *TAF14* raste i na koncentracijama tvori koje suzbijaju rast divljeg tipa. Analiza ekspresijskog profila sojeva izloženih stresu stanične stijenke u odnosu na standardne uvjete kod *S. cerevisiae* pokazuje da je, u odsutnosti Taf14, manje diferencijalno ekspimiranih gena (ukupno 906, a kod divljeg tipa 1538; nakon primjene filtera  $FC = 1$  uz  $FDR \leq 0,01$ ) među kojima je i manji broj gena čiji FC prelazi 2 odnosno -2. Općenito, kod mutanta *TAF14* dolazi do pokretanja puteva održavanja integriteta stanične stijenke i očekivanih procesa, ali je on slabiji nego kod divljeg tipa.

Filamentacija podrazumijeva sposobnost organizma da tvori nitaste strukture, da se širi podlogom, prodire unutar podloge i stvara biofilmove te se načelno povezuje s patogenim organizmima. Kvasci *Saccharomyces cerevisiae* sposobni su za filamentaciju, a obzirom da u pravilu nisu patogeni, nekad se taj proces naziva pseudofilamentacijom. Mutanti *TAF14* kod kvasca *S. cerevisiae* pokazali su smanjenu sposobnost širenja po podlozi, kao i prodiranja u podlogu. Sojevi kojima je onemogućena uloga proteina Taf14 u prepoznavanju posttranslacijskih modifikacija (mutacijom W81A) pokazali su fenotip sličan divljem tipu u ovim testovima. Nadalje, kada su izloženi manjku hranjivih tvari (izvora dušika ili glukoze), mutanti *TAF14* ne pokazuju karakteristično grananje kolonija na podlozi, a smanjena je i razina formiranog biofilma na polistirenu u odnosu na divlji tip. Analizom ekspresije gena koji su važni za ove procese, pokazalo se da kod mutanta *TAF14* u uvjetima koji potiču filamentaciju, ne dolazi do aktivacije prepisivanja upute za gen *FLO11* koji kodira ključni protein za različite oblike filamentacije, već ona ostaje na razini koju vidimo u neinduciranim uvjetima. Obzirom da u našim eksperimentalnim uvjetima nismo uočili promjene u ekspresiji gena za Tec1, Snf1 i Mgf1 koji su neki od poznatih regulatora transkripcije *FLO11*, ostaje na budućim istraživanjima razjasniti mehanizam utjecaja odsutnosti Taf14 na aktivaciju transkripcije *FLO11*.

Posljedice odsustva Taf14 u stanici koje su uočene ovim istraživanjem treba promatrati i u kontekstu kompleksa čiji je on dio, a uključeni su u transkripciju, remodeliranje kromatina i preinake histona. Stoga efekti koje vidimo mogu biti posljedica destabilizacije, promjene konformacije, interakcija nekog od kompleksa ili kombinacije nekih od ovih posljedica. Pretpostavlja se da mehanizam stabilizacije i prepoznavanja posttranslacijskih modifikacija koji vjerojatno vrši Taf14, predstavlja dodatni mehanizam u odgovoru kvasca na izazove iz okoliša čije je detalje potrebno razjasniti budućim istraživanjima.

## **8. SUMMARY**



The YEATS domain is a conserved protein structure recently described as a reader of chromatin acylations. Members of this protein family are found in yeast cells (Taf14, Sas5 and Yaf9), pathogenic fungi such as *Candida albicans* (Taf14 and Yaf9) and in humans (GAS41, AF9 and ENL). The main focus of this study, Taf14, is known to interact with transcription factors (TFIID and TFIIF), chromatin remodeling (INO80, RSC and SWI/SNF) and histone modification complexes (NuA3).

Gene transcription by RNA polymerase II is a complex and highly conserved mechanism that ultimately leads to protein production in eukaryotic cells. In order to start transcription, cells need to make compact chromatin accessible to transcription activators and the transcription machinery to form a preinitiation complex (PIC). Regulation of mRNA synthesis is a key process for cell growth, differentiation and metabolism, as well as for dealing with environmental challenges. In this study, we aimed to investigate the role of Taf14 in the cell wall stress response and filamentation since Taf14 is known to be involved in transcription, chromatin remodeling and histone modification. The cell wall stress response and filamentation is important in the context of pathogenic yeasts since filamentation is crucial for their virulence and cell wall proteins are the main therapeutic targets in treatment of yeast infections.

Phenotypic characterization of Taf14 mutants in *Saccharomyces cerevisiae* showed that cells lacking *TAF14* are sensitive to cell wall stress induced by Calcofluor White or Congo Red. Surprisingly, when tested in *Candida albicans*, cells lacking *TAF14* proved to be tolerant to this type of cell wall stress, even when the wild type showed no growth. Expression profile analysis of *Saccharomyces* strains after cell wall stress showed activation of cell wall integrity pathways but to a lesser extent in the *taf14Δ* mutant.

Filament formation, adhesion, surface invasion and biofilm formation are all types of filamentation and are generally associated with pathogenic fungi. The non-pathogenic yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a reliable model for research studies, also undergoes filamentation (sometimes referred to as pseudofilamentation). We found that the *Saccharomyces taf14Δ* mutant, when tested for different types of filamentation, showed less filament formation, less agar adhesion and no agar invasion. Also, when faced with nitrogen deprivation, *TAF14* mutants showed round shapes rather than characteristic elongated and branched forms. Gene expression analysis of *Saccharomyces* strains grown with low glucose sources (to induce filamentation), showed no upregulation of the key filamentation regulator Flo11 in the *TAF14*

mutant. Since we could not explain this with changes in other Flo11 regulators (Tec1, Snf1 and Mfg1) in our experimental setting, details of this are to be investigated in future studies.

These results can be assigned to the possible destabilization of transcription, chromatin remodeling or histone modification complexes. It is proposed that Taf14, as a subunit of various transcription-related complexes, plays a role in recruitment and stabilization of these complexes as part of a back-up mechanism in the cellular stress response.

## **9. PRILOZI**

Tablica P1. Analiza rezultata RNAseq na platformi STRING. Trajne poveznice na rezultate dobivene za diferencijalno eksprimirane gene čija je ekspresija barem dva puta veća odnosno manja od uspoređivanog para.

WT\_nt vs. MUT\_nt

---

$\log_2 FC \geq 1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bQE3F8uaqxn6>

$\log_2 FC \leq -1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=b0laD9w1ICBW>

WT\_nt vs. WT\_CFW

---

$\log_2 FC \geq 1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=b6R412G49aXC>

$\log_2 FC \leq -1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bxefHnDNhzPS>

MUT\_nt vs. MUT\_CFW

---

$\log_2 FC \geq 1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bVoYGwhx0mJq>

$\log_2 FC \leq -1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bY9UWvdqr4W3>

WT\_CFW vs. MUT\_CFW

---

$\log_2 FC \geq 1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=b11FHneDaTzV>

$\log_2 FC \leq -1$  <https://version-11-5.string-db.org/cgi/network?networkId=bAxp7E1KIZy5>

Tablica P2. Geni s povećanom ekspresijom nakon izlaganja stresu stanične stijenke. Odabrani su geni prema rezultatima iz članka Boorsma *et al.*, 2004 koji su, među ostalim, proučavali ekspresiju gena nakon izlaganja CFW (aliquot prekonocne kulture je uzgajan 2 sata uz 10 µg/mL CFW). Prikazani su rezultati iz članka (stupac Boorsma, u kurzivu) dobiveni metodom microarray, te naši rezultati diferencijalne ekspresije gena (RNAseq) nakon tretmana CFW za divlji tip i mutant *taf14ΔΔ*. Usporedba je napravljena isključivo za kvalitativnu provjeru rezultata, obzirom da su prikazani rezultati dobiveni različitim metodama i obradama podataka (FC i log<sub>2</sub> FC). Zadnji stupac je informativni izračun razlike diferencijalne ekspresije gena za divlji tip i mutant. Tablica se nastavlja na sljedećoj stranici.

		<i>Boorsma</i>	RNA seq		
		<i>FC</i>	log <sub>2</sub> (FC)		
<b>Održavanje stanične stijenke</b>			(1) WT_nt vs. WT_CFW	(2) MUT_nt vs. MUT_CFW	(1)/(2)
	YLR194C	3.17 ± 0.34	3.039730415	3.098358668	1.0
CWP1	YKL096W	2.74 ± 0.29	5.763253329	4.065180635	1.4
KDX1	YKL161C	2.68 ± 0.23	4.87994351	2.649107557	1.8
PIR3	YKL163W	2.67 ± 0.21	7.751706351	5.94437192	1.3
SED1	YDR077W	2.48 ± 0.07	2.47577557	1.571589935	1.6
GFA1	YKL104C	2.38 ± 0.21	3.18816987	2.926374587	1.1
PST1	YDR055W	2.35 ± 0.14	3.803349924	3.378136754	1.1
HSP150 (PIR2)	YJL159W	2.16 ± 0.12	1.638386021	1.875702663	0.9
YPS3	YLR121C	2.11 ± 0.09	3.827476054	2.945771919	1.3
PIR1	YKL164C	2.08 ± 0.08	1.6797603	1.724038827	1.0
KTR2	YKR061W	1.90 ± 0.08	2.827741629	3.667261376	0.8
CRH1	YGR189C	1.88 ± 0.04	2.071912416	1.066941147	1.9
SLT2	YHR030C	1.87 ± 0.19	2.335589502	2.509041279	0.9
CIS3	YJL158C	1.68 ± 0.11	2.001532582	N/A	N/A
BGL2	YGR282C	1.65 ± 0.08	1.308762194	1.111663764	1.2
	YLR042C	1.56 ± 0.07	5.570053568	3.112056076	1.8
TRS65 (KRE11)	YGR166W	1.51 ± 0.05	2.546048388	2.079080989	1.2
ECM4	YKR076W	1.50 ± 0.02	3.57700503	1.567376441	2.3
CCW14	YLR390W-A	1.50 ± 0.03	1.522766609	1.145779092	1.3
CWP2	YKL096W-A	1.37 ± 0.04	3.481091787	1.601841173	2.2
<b>Opći stanični stres</b>					
PNC1	YGL037C	2.05 ± 0.12	4.134505855	1.46009207	2.8
GPD1	YDL022W	2.04 ± 0.08	3.832811165	1.487514334	2.6
HSP12	YFL014W	1.88 ± 0.22	5.8539742	1.404756557	4.2
HSP42	YDR171W	1.75 ± 0.07	2.982660317	N/A	N/A

GPP2 (HOR2)	YER062C	1.57 ± 0.06	5.355425155	N/A	N/A
DDR48	YMR173W	1.53 ± 0.05	4.467092859	1.540772875	2.9
DDR2	YOL052C-A	1.38 ± 0.04	N/A	2.316080511	N/A

#### Ostale funkcije

NMT1	YLR195C	2.75 ± 0.20	N/A	N/A	N/A
CRG1	YHR209W	2.55 ± 0.27	5.819380975	4.328280676	1.3
AFR1	YDR085C	2.10 ± 0.22	4.331097061	3.819833473	1.1
PRM10	YJL108C	1.79 ± 0.08	3.049644803	2.77887393	1.1
HXK1	YFR053C	1.70 ± 0.14	3.889118336	N/A	N/A
ASH1	YKL185W	1.65 ± 0.05	N/A	1.228849235	N/A
	YHR138C	1.60 ± 0.11	1.971661806	1.092312233	1.8
FBP26	YJL155C	1.60 ± 0.00	2.757569201	2.379413496	1.2
MRP8	YKL142W	1.57 ± 0.10	1.643001257	N/A	N/A
VRP1	YLR337C (YLR337W)	1.51 ± 0.01	2.114352496	N/A	N/A

#### Nepoznate funkcije

PRM5	YIL117C	2.35 ± 0.16	6.019826633	4.536507341	1.3
	YPL088W	2.20 ± 0.16	3.185016416	2.191363999	1.5
SRL3	YKR091W	2.04 ± 0.23	4.14294616	3.953674009	1.0
PRY2	YKR013W	1.79 ± 0.11	2.089971269	N/A	N/A
	YBR071W	1.75 ± 0.08	2.472058706	N/A	N/A
PUN1	YLR414C	1.75 ± 0.05	2.446317561	1.400762906	1.7
FLC2	YAL053W	1.70 ± 0.03	1.563544556	1.538222452	1.0
	YDL124W	1.69 ± 0.10	3.861520234	N/A	N/A
	YMR315W	1.67 ± 0.07	3.745387802	2.748424759	1.4
	YBR053C	1.65 ± 0.08	2.560981901	1.036915933	2.5
SDS24	YBR214W	1.64 ± 0.06	3.091805612	1.642973271	1.9
YET1	YKL065C	1.63 ± 0.07	2.272784892	1.654751916	1.4
FMP33	YJL161W	1.58 ± 0.06	5.044834714	3.79149577	1.3
MPM1	YJL066C	1.52 ± 0.02	2.044812628	1.209124738	1.7

## **10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA**

Rođena sam 6. prosinca 1987. godine u Splitu. Nakon završene gimnazije (I. gimnazija Split, klasični program), upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu. Obranom diplomskog rada "Mapiranje interakcijskih domena kvašćevog proteina Taf14" (pod vodstvom dr. sc. Mary Sopta) stekla sam zvanje magistre molekularne biologije. Tijekom zadnjih godina fakulteta volontirala sam na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a, a potom i u Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković (kasnije i u okviru programa stručnog osposobljavanja za rad bez zasnivanja radnog odnosa). Krajem 2014. počela sam raditi kao asistent na Katedri za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu gdje sam, uz izvođenje nastave na hrvatskom i engleskom jeziku, sudjelovala i u provedbi tada aktualnih znanstvenih projekata katedre. Za rad u nastavi (u suradničkom zvanju) dobila sam pohvalnicu Medicinskog fakulteta za najkvalitetnije izvođenje nastave za akademsku godinu 2014./2015. koja se dodjeljuje prema rezultatima studentskih anketa. Početkom 2016. godine pružena mi je prilika ponovo se priključiti grupi dr. sc. Sopta u provedbi dvogodišnjeg projekta financiranog iz fonda Jedinstvo uz pomoć znanja u suradnji s dr. sc. Anom Traven. Kao dio ovog projekta, provela sam šest mjeseci u laboratoriju pri Sveučilištu Monash u Melbourneu. Nedugo nakon povratka u Hrvatsku, u svibnju 2017. predstavila sam prve rezultate istraživanja na kongresu HFP- *Human Fungal Pathogens* u Nici u Francuskoj za što sam dobila stipendiju udruge FEBS za mlade znanstvenike. Sredinom 2019. godine počela sam raditi kao molekularni citogenetičar u Dječjoj bolnici Zagreb, a od kraja 2021. radim u Imunološkom zavodu kao stručni suradnik u Odjelu za osiguranje kvalitete. Koautor sam ukupno šest znanstvenih članaka i devet kongresnih priopćenja.

#### Publikacije:

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., and Traven A. (2020): The YEATS Domain Histone Crotonylation Readers Control Virulence-Related Biology of a Major Human Pathogen. *Cell Reports* DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107528

Popović M., Matana A., Torlak V., Boutin T., Brdar D., Gunjača I., Vidan N., Kaličanin D., Kolčić I., Boraska Perica V., Punda A., Polašek O., Barbalić M. Hayward C., Zemunik T. (2019): Genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with free triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone. *J Endocrinol Invest.* DOI:10.1007/s40618-019-01030-9.



Boljat A., Gunjača I., Konstantinović I., Vidan N., Boraska Perica V., Pehlić M., Škrabić V., Zemunik T. (2017): Environmental Risk Factors for Type 1 Diabetes Mellitus Development. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. DOI: 10.1055/s-0043-109000

Nemet J., Vidan N. and Sopta M. (2017): A meta-analysis reveals complex regulatory properties at Taf14-repressed genes. *BMC Genomics*. DOI: 10.1186/s12864-017-3544-6

Brčić L., Barić A., Gračan S., Brdar D., Torlak Lovrić V., Vidan N., Zemunik T., Polašek O., Barbalić M., Punda A., Boraska Perica V. (2016): Association of established thyroid peroxidase autoantibody (TPOAb) genetic variants with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*. DOI: 10.1080/08916934.2016.1191475

Nemet J., Vidan N., Sopta M. (2014): Gene regulation via long non-coding RNAs – lessons from yeast, *Periodicum biologorum*, vol.116, no.4