

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**PURĪNU AUKSOTROFIJAS IETEKME UZ MAIZES RAUGA *S.*
CEREVISIAE SUBLETĀLO STRESU IZTURĪBU**

BAKALaura DARBS

Autors: Ilze Vamža
Stud. apl. Nr. iv13051
Darba vadītājs: Maģ. biol. Agnese Kokina

Rīga 2016

KOPSAVILKUMS

Darbā tika pārbaudīta maizes rauga stresa izturība purīnu trūkuma gadījumā.

Ietekme uz izdzīvotību tika novērtēta audzējot gan auksotrofu, gan prototrofa celmu šūnas barotnēs ar atšķirīgu oglekļa avotu un purīnu sastāvu, pēc tam visus paraugus pakļaujot subletālam oksidatīvajam, termiskajam vai vāju skābju stresam stresam un novērtējot izdzīvotību.

Darbā konstatēts, ka adenīna trūkums izraisa visu trīs pētīto stresu izturības pieaugumu. Oksidatīvā stresa izturības pieaugums var tikt izskaidrots ar elpošanas pieaugumu purīna trūkuma gadījumā, bet termiskā un vāju skābju stresa izturība nepieaug pie oksidatīva oglekļa avota, bet to ietekmē guanīna klātbūtne. Rezultāti ļauj secināt, ka purīnu badošanās izraisītā stresa izturība nav izskaidrojama tikai ar šūnu arestu vai palielinātu elpošanu, bet arī signālceļu iesaisti izturības fenomenā.

Atslēgas vārdi: adenīns, guanīns, oksidatīvais stress, karstuma stress, acetāta stress, oglekļa avots, *S. cerevisiae*, badināšana

SUMMARY

Stress resistance of *S. cerevisiae* in case of purine starvation was researched.

To assess changes caused by purine starvation auxotrophic and prototrophic yeast strains were grown in media with varying carbon and purine content and exposed to sublethal oxidative, thermic and weak acid stress.

Adenine starvation elicited an increase of resistance to all three researched stresses. Only the oxidative stress resistance can be explained by switch in carbon metabolism. Thermic and weak acid stress resistance was not increased when grown on galactose, but it was influenced by guanine addition. Results imply that stress resistance of purine starved cells can not be explained by a cell cycle arrest or an increase of respiration alone and intracellular signaling is likely involved.

Tags: adenine, guanine, oxidative stress, heat shock, acetate stress

SATURS

IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI.....	6
IEVADS.....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Maizes rauga <i>Saccharomyces cerevisiae</i> raksturojums.....	8
1.2. Galaktozes un glikozes metabolisms.....	11
1.3. Maizes rauga <i>S. cerevisiae</i> subletālais stress.....	12
1.3.1. Oksidatīvais stress	12
1.3.2. Acetāta stress.....	13
1.3.3. Termiskais stress.....	14
1.4. Auksotrofijas.....	14
1.5. Purīnu nozīme <i>S. cerevisiae</i> šūnā.....	15
2. MATERIĀLI UN METODEDES	18
2.1. Celmu izcelsmes apraksts	18
2.2. Aparatūra	18
2.3. Barotnes.....	19
2.4. Materiāli.....	22
2.5. Eksperimenta kopējā shēma	23
2.6. Subletālo stresu apstākļu noteikšana.....	25
2.7. Purīnu pieejamības ietekmes novērtējums uz šūnu stresa izturību.....	26
2.8. Datu apstrāde	26
2.9. Īpatnējā augšanas ātruma iegūšana.....	27
2.10. FACS analīze DNS daudzumam šūnās.....	27
3. REZULTĀTI.....	28
3.1. DNS daudzuma mērījumi R5.0 šūnās.....	30
3.2. Izdzīvotības noteikšana pēc stresa.....	31
3.2.1. Termiskais šoks	31
3.2.2. Oksidatīvais stress	33
3.2.3. Acetāta stress.....	34
3.3. Sārma ietekme uz izdzīvotību paragos, kur pievienots Gua	35
3.4. Izdzīvotības pārskats	37
4. DISKUSIJA.....	38
4.1. Barotnes sastāva ietekme uz šūnas izdzīvotību.....	39

4.1.1. Pēc oksidatīvā stresa	39
4.1.2. Pēc karstuma šoka	39
4.1.3. Pēc etiķskābes stresa	40
4.2. Turpmākie pētījumi	40
SECINĀJUMI	42
PATEICĪBAS	43
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	44

IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

ATF – Adenozīntrifosfāts

cAMP – cikliskais adenīna monofosfāts

DNS – Dezoksiribonukleīnskābe

GDF– guanīndifosfāts

GTF – guanīntrifosfāts

kvv- koloniju veidojošā vienība

MPA – mikroferolskābe

NADH – nikotīnamīda adenīna dinukleotīds

ORF – transkripcijas sākuma kodons

PKA – proteīnu kinaāze A

ROS – (*angļu val.* – *reactive oxygen species*, jeb skābekļa radikālis)

YPD – (*angļu val.* – *yeast peptone dextrose*) – rauga peptona glikoze

IEVADS

Šajā bakalaura darbā ir apskatīta Maizes rauga subletālo stresu izturība, atkarībā no purīnu pieejamības. Šis raugs cukuru spēj metabolizēt gan oksidatīvi, gan fermentatīvi, tam pielāgojot savu transkriptu sastāvu. Līdz ar oglekļa avota maiņu, mainās arī šūnas īpašības un stresa izturība, tas zināms jau no pētījumiem par šūnu īpašību maiņu atkarībā no augšanas fāzes, kurā kultūra atrodas – prezīzāk, pārslēdzoties no fermentācijas uz elpošanu, kultūrai ieejot stacionārajā fāzē.

Pētījumi uzrādījuši, ka adenīna badinātām šūnām ir augsta žāvēšanas izturība. Adenīna badinātas šūnas arestē šūnas ciklu un straujāk elpo, literatūras dati liecina, ka tas veicina šūnu stresa izturību. Šajā darbā izmantojot dažādus oglekļa avotus un pievienojot dažādus purīnus, tika pētīta adenīna badošanas izraisītā stresa izturība.

Šī darba mērķis ir pārbaudīt adenīna badināto šūnu izturību subletālo stresu apstākļos.

Darba mērķis: novērtēt maizes rauga izdzīvotību pēc dažādiem subletāliem stresiem, atkarībā no purīnu pieejamības.

Darba uzdevumi:

Novērtēt purīnu ietekmi uz šūnu augšanu

Noteikt subletālo sliekšni termiskajam un oksidatīvajam stresam

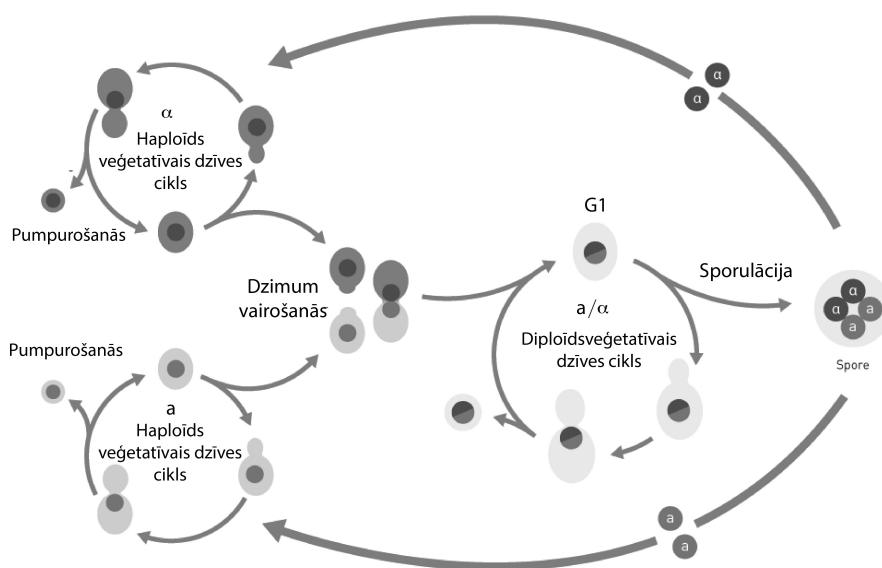
Novērtēt fermentējama un oksidatīvi fermentatīva oglekļa avota ietekmi uz izdzīvotību.

Novērtēt guanīna pievienošanas ietekmi un izdzīvotību.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* raksturojums

Maizes raugs *Saccharomyces cerevisiae* ir vienšūnas sēne, kas neveido micēliju. *S. cerevisiae* šūnas ir ovālas vai olveidīgas formas, ar raksturīgiem izmēriem 3- 8 X 5-10 μm, veido askus ar vienu līdz četrām apaļām askusporām. Rauga šūnas var vairoties dzimumiski haploīdā formā, pēc divu haploīdu saplūšanas veidojas diploīdas šūnas, notiek kariogāmija, kam seko mejoze, kuras rezultātā rodās askusporas (sk. 1. att.). Diploīdas šūnas var arī turpināt pumpuroties (Crous P. W. *et al.* 2009, Slaughter J. C. 2003). *S. cerevisiae* ir šķirti dzimumui α un a , lai notiktu haploīdu saplūšana, šūnām ar atšķirīgiem dzimumiem jānonāk ciešā kontaktā. α šūnai atrodoties tuvumā a šūnai tiek izdalīts α -faktors, kas apstādina a šūnas augšanu (Hammond J. R. M. 2003). Dzimuma faktors atrodas lokusā MAT, ja tajā ir gēns a – raugam būs a dzimums, ja α , attiecīgi α dzimums. Neskatoties uz to, ka *S. cerevisiae* vienmēr var būt tikai MATa vai MAT α , mobilo ģenētisko elementu dēļ dzimums var tikt mainīts (Brock T. D, Madigan M. T. 1988).

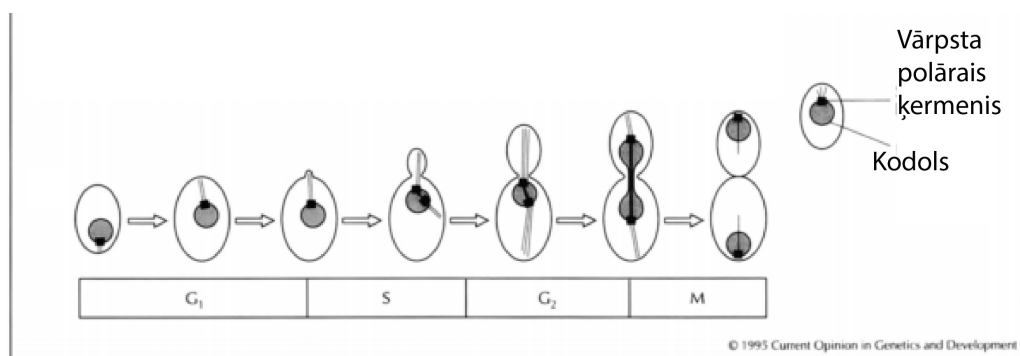


1. attēls. *S. cerevisiae* dzīves cikls. Attēls ar modifikācijām no www.singerinstruments.com

Figure 1. The life cycle of *S. cerevisiae*. Picture with modifications from www.singerinstruments.com

S. cerevisiae jaunas šūnas veido pumpurojoties. Pumpurojoties rauga šūna pagarinās un pēc DNS dubultošanās jaunais kodols migrē uz pumpuru. Pēc jaunā kodola iekļūšanas pumpurā, tiek izveidota šūnas sieniņa starp jauno pumpuru un mātes šūnu. Ja pumpuri nespēj atdalīties, veidojas pseidohifas (Tortora G.J. *et al.* 1989). Tā kā jauns pumpurs sāk veidoties

šūnas cikla G₁ fāzē, pēc šūnas izskata iespējams noteikt kādā šūnas cikla fāzē tā atrodas(sk.2. attēlu)(Lew D.J., Reed S.I. 1995).



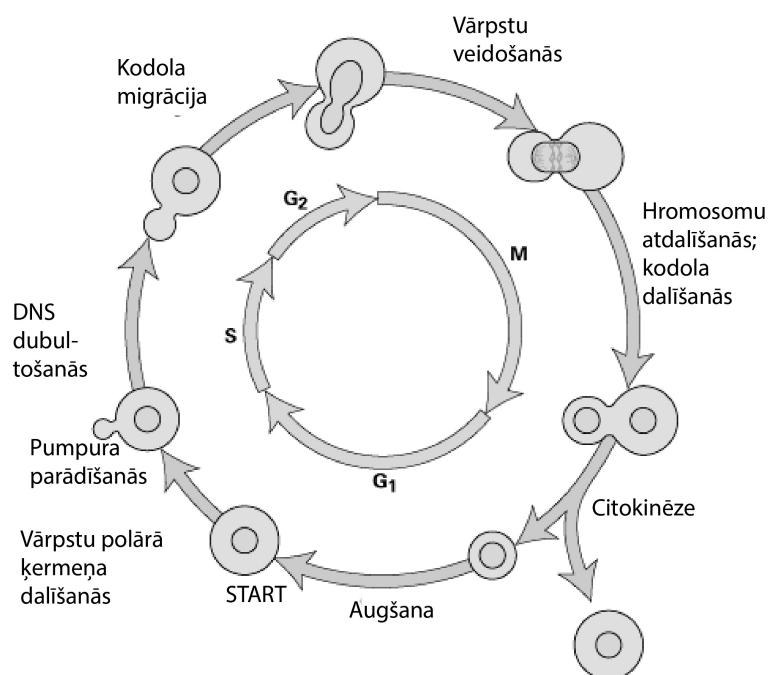
2. att. *S. cerevisiae* morfoloģija attiecīgā šūnas cikla fāzē. Ar modifikācijām no Tortora Lew D.J., Reed S.I. 1995.

Figure 2. *S. cerevisiae* cell morphology in various phases of the cell cycle. With modifications from Lew D.J., Reed S.I. 1995.

Visām eikariotu šūnām raksturīgās fāzes tiek izdalītas pēc tajās notiekošajiem procesiem – G₁ fāzē šūnā tiek aktīvi uzņemtas barības vielas un sintezēti tai raksturīgie proteīni, S fāzē kodolā notiek DNS dalīšanās, G₂ fāzē šūna aug izmēros un M fāzē notiek mitoze (Baumanis, Krūmiņa 2015). Ja vidē iestājas barības vielu izsīkums, tad šūna ieiet miera, jeb G₀ fāzē, kurā tā var palikt pat līdz šūnas nāvei, bet iziet no tās, ja vidē atkal parādās barības vielas (Shi, Tu 2013).

Parasti šūna nav viena, bet populācijā, kura tiek pakļauta līdzīgiem ārējās vides apstākļiem, piemēram, periodiskajā kultūrā. Šādā kultūrā var raksturot trīs stadijas – lag fāze, eksponenciālās augšanas (log) fāze un stacionārā fāze. Šīs fāzes var noteikt grafiski attēlojot dzīvotspējīgo šūnu daudzumu kultūrā attiecībā pret laiku (Walker 2000). Šī fāžu attiecība un ilgums lielā mērā atkarīga no ārējās vides apstākļiem – temperatūras un pieejamās barības daudzuma (Torija *et al.* 2003). Lag fāzes šūnas pielāgojas jauniem apstākļiem, tāpēc grafiski nebūs redzama kultūras augšana, log fāzei raksturīga strauja augšana – periodiska kultūras dubultošanās, stacionārajai fāzei raksturīga augšanas apstāšanās, jo barības vielas vidē ir izsīkušas (Kłosinska *et al.* 2011; Todar 2012).

Bioķīmiski šūnas stadiju var raksturot pēc tajā uzkrātajiem transkriptiem, maizes raugam tiek izšķirtas trīs stadijas (sk. 2. attēlu) $G_1 \rightarrow S$, $G_2 \rightarrow M$ un $M \rightarrow G_1$ (Bertoli C. *et al.* 2013).



3. attēls. *S. cerevisiae* šūnas cikls. Ar pārmaiņām no Bertoli C. *et al.* 2013

Figure 3. The cell cycle of *S. cerevisiae*. With changes from Bertoli C. *et al.* 2013

Tāpat kā daudziem mikroorganismiem, arī maizes raugam izšķir vairākus celmus, tie ir labi izpētīti raugi, kuru genotips ir zināms un kosekvēnts. *S. cerevisiae* ir eikariots, kura kodolā atrodas 16 hromosomas. Maizes rauga ģenētika ir labi izpētīta, vairāku celmu genomi nosekvenēti un anotēti. Kopējais nosekvenētais genoms 13 392 kb, kurā ir 6,604 ORF, no kuriem 78% ir zināmas funkcijas (Anonymus 2016; Campbell *et al.* 2003). Ir pieejamas arī plašas datubāzes par rauga ģenētiku un funkcionālajiem gēniem, piemēram, www.yeastgenome.org, www.euroscarf.de.

Viens no iemesliem kādēļ maizes raugs ir eikariotu šūnu modeļorganisms, ir tā samērā vienkāršā kultivācija. Šis raugs spēj augt gan aerobi, gan anaerobi. Tā kultivācijas temperatūra ir no +5 līdz +35°C un tā augšanai nepieciešams kāds no fermentējamajiem cukuriem, mikroelementi, makroelementi un vitamīni. Barības vielu prasības un to daudzums dažādiem celmiem var atšķirties (Campbell *et al.* 2003).

Rauga latīniskais nosaukums *Saccharomyces* – "cukura sēne" – norāda uz tā spēju iegūt enerģiju no cukura. Šis raugs cukuru spēj metabolizēt gan oksidatīvi, gan fermentatīvi. Glikoze tiek šķelta glikolīzē līdz piruvātam fruktozes-bis fosfātu ceļā. Piruvāts var tikt fermentēts par CO₂ un spirtu vai noārdīts Krebsa ciklā.

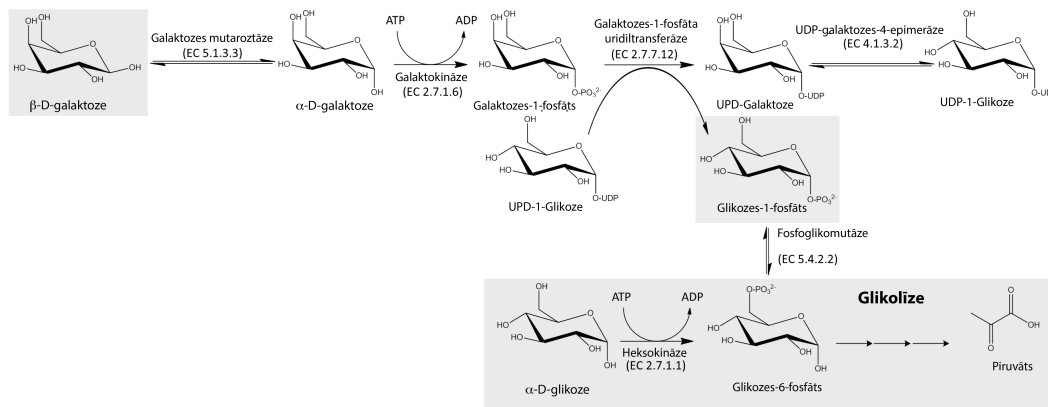
Pastēra efekts nosaka piruvāta noārdīšanas ceļu - anaerobos apstākļos tas tiks pārvērsts etanolā, aerobos – CO₂. Novērotais Pastēra efekts raugos rāda, ka aerobos apstākļos tas ir spējīgs saražot 20 reizes vairāk biomasas, jo anaerobos apstākļos cukura fermentācijas process ņem virsroku. (Schlegel H.G. 1995.) *S. cerevisiae* ir novērojams arī krebtrī efekts, kad fermentācija noris arī aerobos apstākļos, jo šādā veidā glikoze tiek metabolizēta ātrāk. Lai krebtrī efekts tiktu novērots, glikozes koncentrācijai jābūt lielākai kā 0,9g/L (Fugelsang, Edwards 2007)

1.2. Galaktozes un glikozes metabolisms

S. cerevisiae metabolismā spēj patērēt dažādas heksozes, bet nepārstrādā vairumu oligosaharīdu, kas rodas hidrolizējot cieti, neizmanto celulozi, hemicelulozi, cellobiozes vai vairumu pentožu (Glazer, Nikaido 2007). Šajā nodaļā tiks apskatīts glikozes un galaktozes metabolisms, jo šīs heksozes ir izmantotas rauga audzēšanai šajā darbā.

Normālos apstākļos no glikozes tiek iegūta enerģija glikolīzes ceļā, t.i., no vienas glikozes molekulas tiek iegūtas 2ATF, 2NADH un 2 piruvāta molekulas. Iegūtais NADH atkal tiek oksidēts aerobos apstākļos oksidatīvajā fosforilēšanā vai fermentācijas ceļā, kad šūnā ir zems NAD⁺ daudzums (Fugelsang K.C., Edwards C.G. 2007; Tortora 1989).

Glikolīzes ceļā darbojošies enzīmi spēj atšķirt tikai noteiktu heksozi – α-D-glikozi, tāpēc, lai maizes raugs spētu no galaktozes iegūt enerģiju tā sākumā jāpārveido par α-D-glikozi. Šī pārveidošana notiek Leloir ceļā, kurā piedalās pieci enzīmi (sk. 4 att.) (Timson D.J. 2007) tie ir galaktozes mutarotāze, galaktokināze, uridililtransferāze, UDP-4-epimerāze un fosfoglukomutāze. Šī pārveidošana ir šūnai neizdevīgs process, jo nepieciešami resursi visu enzīmu ražošanai, tāpēc fermentācija galaktozes gadījumā nenotiek – tas rada pārāk maz ATP. Līdz ar to, piruvāts tiek novirzīts Krebsa ciklā un pieaug kultūras prasības pēc skābekļa (Paikē 2008).



4. attēls. Leloir ceļš, kurā galaktoze tiek pārvērsta glikozes-6-P. Ar modifikācijām no http://blog-imgs-51.fc2.com/p/u/r/purposesurpassurplus/Leloir_pathway2.png

Figure 4. Galactose is transformed into glucose-6-P in Leloir pathway. With modifications from http://blog-imgs-51.fc2.com/p/u/r/purposesurpassurplus/Leloir_pathway2.png

1.3. Maizes rauga *S. cerevisiae* subletālais stress

Raugu un citu vienšūnas organismu gēnu ekspresija notiek atkarībā no signāliem, kas nāk no ārvides, ja apstākļi, kuros organismi dzīvo strauji pasliktinās, tiek mainīta gēnu ekspresija un palaisti stresa atbildes mehānismi, kas ļauj pārdzīvot iepriekš letālus apstākļus (Mager *et al.* 1993). Šādus apstākļus sauc par stresa apstākļiem, bet subletālais stress ir tāds stress, kas nomāc organismu augšanu, bet nav pilnībā letāls populācijai, no latīņu val. – “sub” – daļējs, ne līdz galam.

Šajā darbā tika pārbaudīta *S. cerevisiae* purīnu (adenīna) auksotrofa celma R5.0 subletālu stresu izturība. Konkrētie stresi, kādi tika pielietoti ir aprakstīti šajā nodaļā.

1.3.1. Oksidatīvais stress

Skābeklis maizes raugam nepieciešams sākot no oksidatīvās fosforilēšanas līdz sterolu un nepiesātināto taukskābju sintēzei, tomēr skābekļa klātbūtne šūnā rada nevēlamu oksidatīvo stresu – dažādu aktīvo skābekļa radikāļu (ROS) veidošanos, kas bojā šūnu (Gibson *et al.* 2008), ROS bojājumi var skart lipīdus, DNS un enzīmus. Lai novērstu šo skābekļa radikāļu nevēlamo iedarbību uz šūnu, pastāv dažādi mehānismi gan citosolā, gan mitohondrijos, piemēram superoksīda dismutāzes (SOD) un glutaciona peroksidāzes (Griotti 1998). Pieaugošs oksidatīvā stresa atbildes transkriptu daudzums novērots, kad šūnā izsīkst fermentējamo cukuru daudzums (Gibson B. R. *et al.* 2008), piemēram, šajā situācijā aktivē

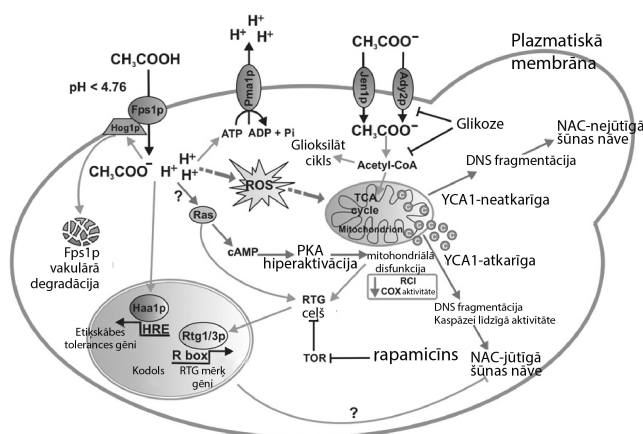
SOD1 transkripciju, kas kodē mitohondriālo Mn atkarīgo superoksīd-dismutāzi. Lielākajai daļai oksidatīvā stresa aizsardzības molekulu ir nepieciešami reducētie ekvivalenti $\text{NADH}\cdot\text{H}^+$ un $\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$, kas reducē oksidētos savienojumus (Breitenbach *et al.* 2012).

Atsevišķi pētījumi pat uzrāda, ka ROS *S. cerevisiae* spēj ierosināt programmētu šūnas nāvi (Madeo *et al.* 1999).

1.3.2. Acetāta stress

Etiķskābe ir vāja organiska skābe, kas dabiski rodas *S. cerevisiae* metabolisma ceļā fermentācijas procesā. Etiķskābes pK_a vērtība ir 4,76, līdz ar to etiķskābe ir nedisociētā formā pH vērtībām esot zem 4,76. Šādā formā etiķskābei ir antimikrobiālas īpašības, jo tā spēj brīvi difundēt caur šūnas membrānu un nonākot citoplazmā, kur $\text{pH} > 5$, un tā dissociē acetātā un H^+ jonus (Taherzadeh *et al.* 1997). *S. cerevisiae* šūnā nedisociētā etiķskābe difundē arī caur Fps1p – akvagliceroporīna kanāliem (sk. 5. att.) (Giannattasio *et al.* 2013).

Kad šūnā ir paaugstināts protonu līmenis, ATPāzes protonu sūknis Pma1p tos virza ārā no šūnas – tas ir process, kas patērē daudz ATF, līdz ar to samazinās biomasas iznākums un *S. cerevisiae* sāk intensīvāk fermentēt, lai atgūtu zaudēto ATF daudzumu (Casey *et al.* 2010). ATF izsīkums šūnā noved pie barības vielu trūkuma, jo īpaši auktotrofos celmos, kas paši nespēj saražot tiem nepieciešamās vielas un uzņem tās no vides ar aktīvo transportu (Ding *et al.* 2013). Ja ārējās vides $\text{pH} > 4,76$, etiķskābe ir dissociējusi acetātā un protonā, tad acetāts ar jonu transportieru palīdzību nonāk šūnā un tiek pārvērsts acetilkoenzīmā A un tālāk piedalās šūnas metabolismā, ieejot Krebsa ciklā (Whiting 1977; Giannattasio *et al.* 2013).



5. attēls. Akumulējušies protonu šūnā izraisa bojājumus un ROS veidošanos. Attēls ar modifikācijām no Giannattasio S. *et al.* 2013

Figure 5. Proton accumulation in cytosol causes cell damage and accumulation of ROS. Picture with modifications from Giannattasio S. *et al.* 2013

Attēlā 5. redzams, ka protonu uzkrāšanās rezultātā radušies skābekļa radikāļi bojā šūnas struktūras, citohroms c tiek atbrīvots citosolā un noved pie mitohondriju bojāejas. Pētījumi liecina, ka atkarībā no etiķskābes koncentrācijas *S. cerevisiae* var izšķirt gan programmētu, gan dabisku nāvi. Etiķskābes koncentrācijas, kas zemākas par 80mM novēroti tādi apoptozes marķieri kā hromatīna kondensēšanās gar kodola membrānu un DNS fragmentēšanās (Ludovico *et al.* 2001).

1.3.3. Termiskais stress

Kā jau šajā darbā tika minēts, *S. cerevisiae* aug temperatūrās no +5 līdz 35°C, ja vides temperatūra pārsniedz +35°C, raugs nonāk termiskajā jeb karstuma stresā. Literatūrā minēts, ka tas veicina *S. cerevisiae* šūnas arestu G₁ fāzē un no 500 pārbaudītiem proteīniem, aptuveni 300 proteīnu sintēzes apjomi samazinās (Mager, Ferreira 1993), tas ir skaidrojams ar temperatūras ietekmi uz proteīniem – tai paaugstinoties, proteīni denaturējās, līdz ar to proteīnu sintēze būtu nelietderīgs, pat šūnai bīstams process.

Tā kā vienšūnas organismi nespēj aktīvi regulēt savu temperatūru, līdz ar to ir ļoti jūtīgi uz apkārtējās vides temperatūru, tiem nepieciešams mehānisms, lai izdzīvotu, vides temperatūrai mainoties uz nelabvēlīgu. Raugiem, temperatūrai paaugstinoties virs optimālās augšanas temperatūras, ir speciāla sistēma, ko sauc par HSR (*angļu val. "heat shock response"* – karstuma šoka atbilde), šo stāvokli pavada aktīva Hsps – karstuma šoka proteīnu sintēze (Walker 2000). Parasti Hsp1 transkripcijas faktora aktivētu gēnu ekspresija notiek apmēram 20 – 40 minūtes, vairums šo gēnu darbojās kā čaperoni un palīdz karstuma šoka bojātos proteīnus salocīt pareizi, vēl aktīvs ir ubikvitīns, kā zināms, tas iezīmē bojātos proteīnus to iznīcināšanai, šis mehānisms palīdz šūnai atbrīvoties no bojātiem proteīniem, kas var būt potenciāli bīstami (Morano *et al.* 2012; Mager, Ferreira 1993.).

Paaugstinātā temperatūrā intensīvāk notiek membrānas lipīdu nevēlama oksidācija, līdz ar to redzams, ka termiskais stress noved pie oksidatīvā stresa šūnā (Piper 1995), tāpat kā tas bija novērojams etiķskābes stresa gadījumā.

1.4. Auksotrofijas

Eikariotu ģenētiskā inženierijā alternatīvi dažādu antibiotiku rezistences izmantošanai, tiek lietoti auksotrofie marķieri, tas nozīmē, ka prototrofam celamam tiek apzināti sabojāti kādi no gēniem, kas kodē kāda biosintēzes ceļa enzīmus. Iegūtie mutanti spēj augt tikai vidē, kur pieejamas visas augšanai nepieciešamās vielas, tajā skaitā tās, ko mutāciju rezultātā vairs nespēj saražot paši (Brock, Madigan 1988). Šo īpašību var izmantot transformācijā, līdz ar

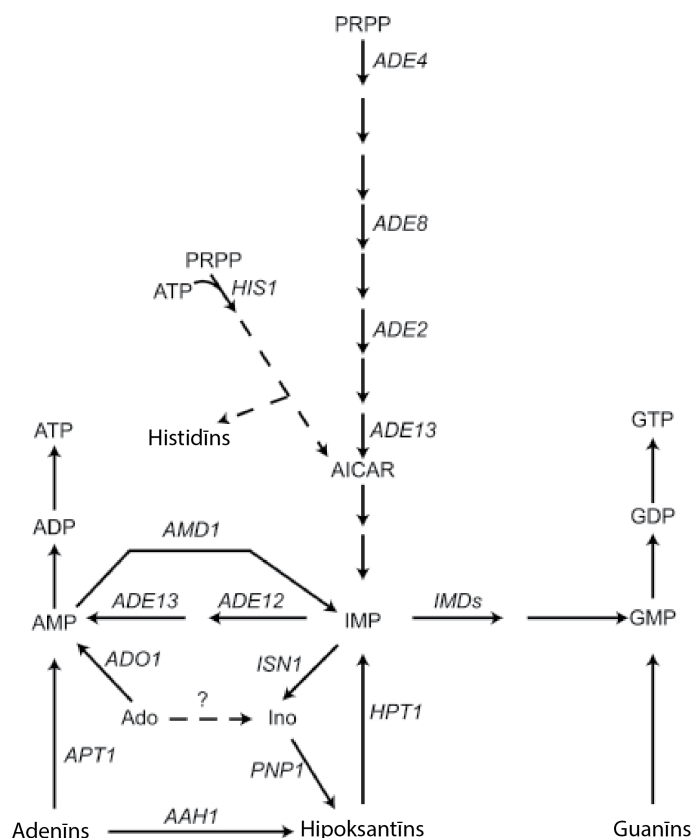
vēlamo gēnu organismā atkal ievietot kādu bojāto sintēzes gēnu, tā organisms atkal pats spēs saražot kādu sev nepieciešamo vielu (Pronk 2002). Tomēr ir pētījumi, kas norāda, ka šajos auksotrofajos celmos notiek arī nevēlamas fizioloģiskas blakusparādības. Piemēram, pētījums ar CEN.PK leicīna auksotrofu celmu uzrāda, ka šādam celmam, lai augšanas līkne līdzinātos prototrofa celma līknei, barotnē jāpievada daudz vairāk leicīna kā teorētiski būtu nepieciešams (Cakar *et al.* 1999). Eksperimentā, kur pārbaudīta šādu auksotrofu celmu stresa izturība pierādīts, ka pie pieņemtā aminoskābju daudzuma, celmu stresa izturība samazinās, bet pievienojot nepieciešamās aminoskābes 5 reiz vairāk, izturība atgriežas prototrofā celma izturības robežās (Gomes 2007).

1.5. Purīnu nozīme *S. cerevisiae* šūnā

Šajā darbā izmantots celms, kas ir adenīna auksotrofs – tas nespēj sintezēt purīnus. Kopumā purīni ir trīs – adenīns, iozīns un guanīns, 6. attēlā redzams, ka visi trīs purīni tiek sintizēti vienā metabolisma ceļā, tā kā darbā izmantotajam celmam R5.0 ir defektīvs *ade8* gēns, tas nespēj sintizēt nevienu no purīniem.

Purīni ir cikliski slāpekļa savienojumi, kas sastāv no viena pieclocekļu un viena sešlocekļu cikla ar diviem kopīgiem oglekļa atomiem, katrā ciklā divi no locekļiem ir slāpekļa atomi (Berg *et al.* 2002). Tie ir ne tikai DNS sastāvā, bet ietilpst arī tādu nozīmīgu bioloģisko molekulu kā ATF, NAD(P)H, FADH, CoA un cAMP sastāvā, tādejādi nodrošinot enerģijas un signālu pārnesi šūnā (Braun-Falco *et al.* 2000; Zaikov 2004).

Purīni šūnās ir nozīmīgas molekulas, kas darbojas tajā gan strukturālā, gan enerģētiskā, gan signālceļu līmenī. Pretēji augstākiem organismiem, raugiem uz šūnas virsmas nav purinergisku receptoru – tie nespēj uztvert no ārējās telpas purīnu signālus, bet novērots, ka glikozes klātbūtnē tie sekretē ATF ārējā vidē (Esther Jr. *et al.* 2008). Literatūrā ir izteiktas teorijas, ka rauga šūnās noteiktā ATF/GTF proporcija ir svarīga augšanas procesiem un GTF trūkums varētu izskaidrot dažu mutantu augšanas traucējums (Saint-Marc *et al.* 2009). Pētījumos, kur izmantota mikoferolskābe (MPA), lai inhibētu GMP ražošanu no inozitol monofosfāta (IMP) novērots, ka proporcionāli MPA pievienošanai pieaug arī šūnu dalīšanās laiks, bet sistēmai pievienojot guanīnu, dalīšanās laiks atkal nostabilizējas normas robežās (Ecobar-Henriques *et al.* 2001).



6. attēls. Purīnu *de novo* sintēzes ceļi *S. cerevisiae*. Attēls ar modifikācijām no Saint-Marc *et al.* 2009.

Figure 6. Purine *de novo* synthesis pathway in *S. cerevisiae*. Picture with modifications from Saint-Marc *et al.* 2009.

Purīnu signāli šūnā arī pārnes informāciju par barības vielām, tā pārslēgšanās no elpošanas uz fermentēšanu notiek ~20 mM glikozes, ap šo pašu koncentrāciju glikoze arī aktivē cAMP sintēzi. Saharoze un glikoze ierosina cAMP signālus, bet mannoze darbojas kā antagonists. Gpr1 sasaiste ar glikozi ierosina GTF saites veidošanos (aktīvo Gpa2 formu), tas stimulē adenil-ciklāzes darbību, rezultātā palielinās cAMP daudzums (Busti 2010). Šo signālceļu sauc par Ras-PKA signālceļu, tas nodrošina šūnu augšanu pie pietiekoša oglekļa avota. Raugam ir divas Ras kināzes izoformas – Ras1 un Ras2 (Conrad *et al.* 2014).

RAS2, kas piesaista GDP, ja šūnas ir augušas uz galaktozes, uz glikozes augušām šūnām šāda saistīšanās nenotiek. Saistīšanās notiek arī atkarībā no temperatūras – optimālā saistīšanās t 37°C (nav pārbaudīta temperatūra 30 °C) (Tamanoi *et al.* 1984). Pretēji Ras2 – Ras1 tiek izslēgts, raugam augot uz nefermentējama C avota. RAS2(t⁰ jutīgs) un ras1- mutanti tiek bloķēti G1 stadijā un nepumpurojās. RAS2 mutanti uzkrāj barības vielas un sporulē pilnā barotnē (Tamanoi *et al.* 2011).

cAMP atkarīgā PKA piedalās arī DNS bojājumu kontroles punktā. No pētījumiem ar mutantiem *chk1Δ* zināms, ka PKA var kavēt šūnu pārejā no metafāzes uz anafāzi. Adenilāt ciklāzes pozitīvi regulē cAMP daudzumu šūnā, to negatīvi regulē divas fosfodiesterāzes. Ras1 un Ras2 atkarībā no iekššūnas glikozes daudzuma aktivē adenīn ciklāzi (Wood, Sanchez 2010).

Ar G proteīnu saistītais receptors GPCR atbild par ārpusšūnas glikozes uztveršanu, tā darbojas kā signāla pārnēsētājs starp glikozi un tās inducētiem transporteriem. Augot uz nefermentējama substrāta PKA aktivitāte ir zema, augot uz glikozes PKA aktivitāte ir augsta, bet trūkstot kādam svarīgam barības elementam aktivitāte krītas. Ras aktivācija vēl nav izpētīta, iespējams to aktivē glikozes katabolisma ceļā radušies metabolīti, bet ir zināms, ka Ras aktivē PKA ar iekššūnas vides paskābināšanu kā arī ar GTF saistīta Ras piesaisti (adenil ciklāzes) proteīniem Srv2/CAP. Interesanti, ka cAMP aktivācija stacionārās fāzes šūnās ir nevēlama, jo veicina ROS daudzuma pieaugumu (Conrad *et al.* 2014).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Celmu izcelsmes apraksts

Darbā tika izmantoti vairāki *S. cerevisiae* celmi:

CEN.PK - prototrofs, a dzimuma haploīds celms, dāvana no H. Nielsen, Somija

H1346 ir uz CEN.PK bāzes veidots celms (CEN.PK2 (H1346) (MATa leu2-3/112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8° SUC) dāvana no H. Nielsen, Somija

R5.0 (H146 Δ*ADE8*)

CEN.PK iegūts krustojot ENY.WA-1A un MC996A, H1346 ir auktotrofs celms, kas radīts no CEN.PK. H1346 atšķirībā no CEN.PK nespēj saražot uracilu, leicīnu, triptofānu un histidīnu. R5.0 izveidots no H1346 celma, tam "izsītot" *Ade8* gēnu, kas atbild par purīnu sintēzi.

2.2. Aparatūra

Pētījumā izmantotā aparatūra uzskaitīta 1. tabulā.

1.tabula

Aparatūra

Table 1

Equipment used in this work

Aparatūra Equipment	Ražotājs Producer	Valsts State
<i>Laminārās plūsmas skapis – Flow fast V</i>	<i>Faster</i>	<i>Itālija</i>
<i>Kratītājs – inkubators ES – 20/60</i>	<i>Biosan</i>	<i>Latvija</i>
<i>Maisītājs Bio Vortex VI</i>	<i>Biosan</i>	<i>Latvija</i>
<i>UV/redzamās gaismas spektrofotometrs Ultrospec 2100 pro</i>	<i>Amersham Biosciences</i>	<i>Lielbritānija</i>
<i>Centrifūga 1 – 14</i>	<i>Sigma</i>	<i>Vācija</i>

<i>Termostats TC-80M</i>	<i>Медлабортехника</i>	<i>PSRS</i>
<i>Kratītājs OS 20</i>	<i>Biosan</i>	<i>Latvija</i>
<i>Centrifūga 5810 R</i>	<i>Eppendorf</i>	<i>Vācija</i>
<i>Autoklāvs 2100 Classic</i>	<i>Prestige Medical</i>	<i>Anglija</i>
<i>Analītiskie svāri BP110S</i>	<i>Sartorius</i>	<i>Vācija</i>
<i>Plašu lasītājs Infinite 200 Pro</i>	<i>Tecan</i>	<i>Austrija</i>
<i>Kratītājs – inkubators New Brunswick Scientific I26R</i>	<i>Eppendorf</i>	<i>Vācija</i>
<i>pH – metrs pH 211</i>	<i>Hanna instruments</i>	<i>Rumānija</i>
<i>Termobloks Bio TDB-100</i>	<i>Biosan</i>	<i>Latvija</i>
<i>™ I-26 Stackable Shakers</i>	<i>Eppendorf</i>	<i>Vācija</i>
<i>Svāri "Boeco"</i>	<i>Boeckel</i>	<i>Vācija</i>

2.3. Barotnes

YP_{2%}glikoze

1% Bacto Yeast

2% Bacto Peptone

2% glikoze

YP_{2%}galaktoze

1% Bacto Yeast

2% Bacto Peptone

2% galaktoze

SD (sintētiskā barotne)

0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1g NaCl

0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1g KH_2PO_4

5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1ml 1000x sāļu maisījums

2ml 1000x vitamīnu maisījums

Atšķaida ar destilētu ūdeni līdz 1l

1000x sāļu maisījums

500mg borskābe

40mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

100 mg KI

200 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

400 mg $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

200 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

400 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Atšķaida ar destilētu ūdeni līdz 1l

1000x vitamīnu maisījums

2 mg biotīns

400 mg $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$

2 mg folijskābe

2000 mg inositols

400 mg niacīns

200 mg p-aminobenzoskābes

400 mg piridoksīn HCl

200 mg riboflavīns

400 mg tiamīn HCl

Atšķaida ar destilētu ūdeni līdz 1l

YP_{2%}glikoze agara plates

1% Bacto Yeast

2% Bacto Peptone

2% glikoze

2% agars

YP_{2%}glikoze 100mM acetāta plates

1% Bacto Yeast

2% Bacto Peptone

2% glikoze

3% agars

100mM acetāts

pH tiek panākts ar KOH pievienošanu līdz noteiktajam pH 4,5

Reaģenti

Pētījumā izmantotie reaģenti uzskaitīti 2. tabulā.

2.tabula

Izmantotie reaģenti

Table 2

Reagents used in this work

Nosaukums	Ražotājs	Valsts
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Sigma-aldrich	Vācija
NaCl	ENOLA	ES
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma-aldrich	Vācija
KH ₂ PO ₄	Sigma-aldrich	Vācija
(NH ₄) ₂ SO ₄	Reahim	PSRS
Glikoze	Enola	Latvija
Galaktoze	Sigma-aldrich	Vācija
Agars	Biolife	Itālija
Acetāts	Sigma-aldrich	Vācija
30% H ₂ O ₂	Sigma	Vācija
Adenīns	Sigma	Vācija
Guanīns	Sigma-aldrich	Vācija

Nosaukums	Ražotājs	Valsts
Histidīns	Sigma	Vācija
Uracils	Sigma	Vācija
Triptofāns	Sigma	Vācija
Leicīns	Sigma	Vācija
Vitamīni	Sigma-aldrich	Vācija
Barotnes sastāvdaļas		
Bacto Yeast	Biolife	Itālija
Bacto Peptone	Biolife	Itālija

2.4. Materiāli

Pētījumā izmantotie materiāli uzskaitīti 3. tabulā.

3.tabula

Izmantotie materiāli

Table 3

Materials used in this work

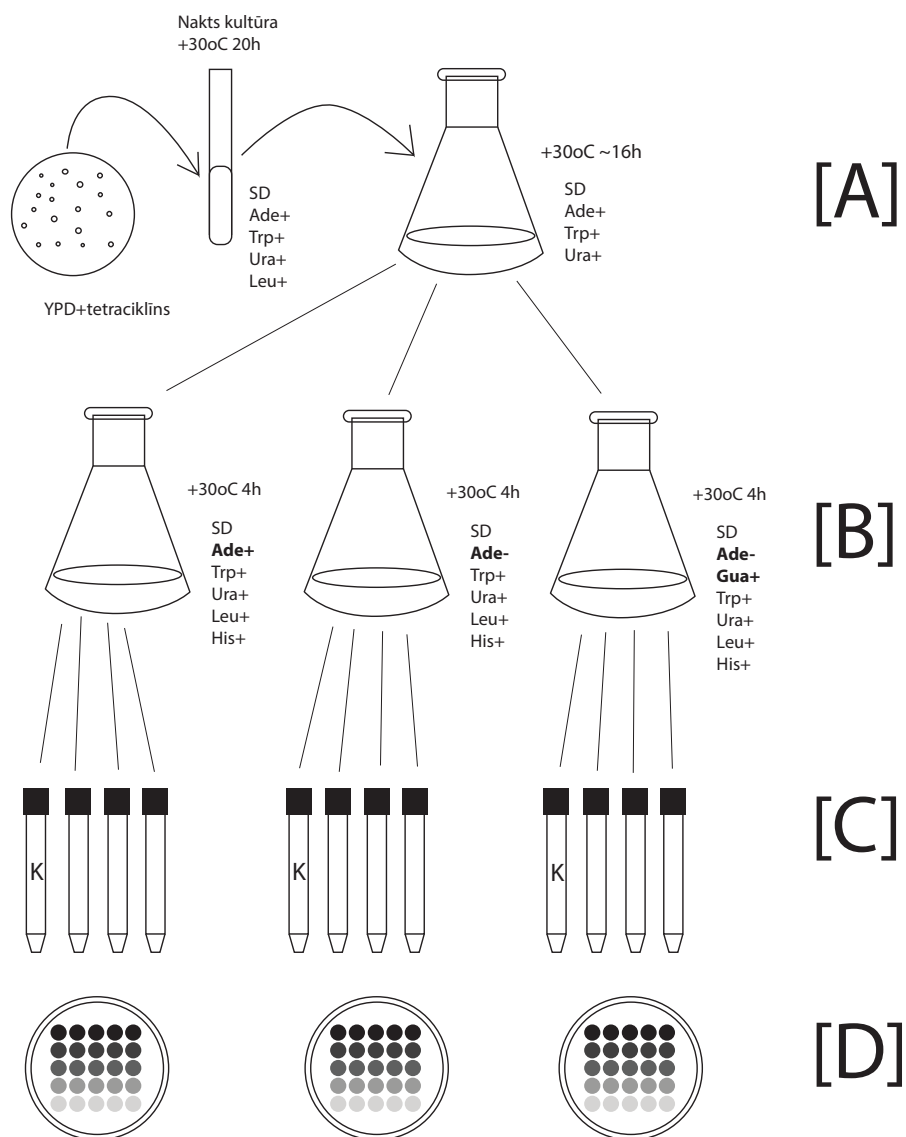
Nosaukums	Ražotājs	Valsts
96 lauciņu PCR plates	Sarsted	Vācija
Petri plates	Sarsted	Vācija
Pipešu uzgaļi	Sarsted	Vācija
Mehāniskās pipetes 100-1000 µl 20-200 µl 5-50 µl 0,5-10 µl	Jencons	ASV
Daudzkanālu mehāniskās pipetes 30-300 µl 10-100 µl 0,5-10 µl	Eppendorf	Vācija
Šļirce 20 ml	B-Braun	Vācija
Filtri 0.2 µm	SMI-LabHut	Lielbritānija

Parafilma	Bemis	ASV
-----------	-------	-----

2.5. Eksperimenta kopējā shēma

Lai pētītu purīnu sastāva ietekmi barotnē uz šūnas subletālo stresu izturību, sākumā visiem stresiem tika atrasts stresora stiprums un iedarbības ilgums, pie kura nomirst vismaz 90%, bet ne visas šūnas no strauji augošās kultūras.

Subletālā stresa izturība tika pārbaudīta strauji augošām kultūrām, kuru optiskais blīvums (OD) nepārsniedz 2 OV. Visi eksperimenti sākās, paņemot no svaigas YPD plates R5.0 celma koloniju un inokulējot nakts kultūrā SD barotnē ar 2% glikozi vai galaktozi (200 rpm, +30oC, aptuveni 22h). Nākamajā dienā tika izmērīts kultūras OD un tās pārsētas kolbās ar pilno SD barotni. Inokulēšanai nepieciešamais nakts kultūras daudzums tika aprēķināts, lai eksperimenta uzsākšanas brīdī kultūru OD būtu robežās no 1 līdz 2, uzskatāma darbības shēma attēlota 7. attēla B daļā.



7. attēls. Kopējā eksperimenta shēma

Figure 7. Overall scheme of the experiment's setup

Vīsi eksperimenti, kuros tika veikta šūnu badināšana, notika pēc 7. attēlā redzamās shēmas. No katra celma tika inokulēta nakts kultūra, kas tika pārsēta kolbā pēc ~20-22h, lai eksperimenta sākumā kultūras būtu aptuveni OD 1. Sākot badināšanas etapu, šūnas tika divas reizes nomazgātas un pārsētas jaunās barotnēs ar eksperimentā nepieciešamo barotnes sastāvu (SD +ura+leu+trp+his+ade; SD +ura+leu+trp+his; SD +ura+leu+trp+his+gua vai atsevišķos gadījumos SD +ura+leu+trp+his +2M KOH līdz 2,5mM). Tālāk šajās barotnēs šūnas tika audzētas 4h, pēc kurām tās atkal tika divas reizes nomazgātas un atšķaidītas ar sterilu ūdeni, un ievietotas vidē, kas rada aktuālo stresu (gala OD 1).

Pēc eksperimenta stresa daļas šūnas tika divas reizes nomazgātas destilētā ūdenī. Lai noteiktu šūnu izdzīvotību izmantota šūnu 10 kārtīgi seriālie atšķaidījumi, kas pilināti uz agarizētām platēm. Šāda metode ļauj noteikt šūnu izdzīvotību plašā spektrā no 0,001 % līdz 100 % (Welch *et al.* 2013).

Šķaidījumu veikšanai tika izmantotas 96 lauciņu PCR plates, pirmajā rindā iepildot pa 200 µl šūnu kultūras ar OD 1, bet katrā nākamajā rindā, kultūru atšķaidot 10 kārtīgi.

Tā iegūstot pat OD $1 \cdot 10^{-4}$ kultūru, no kuras 5 µl tika uzsēti uz YPD agara plates (7. att. D), veicot trīs tehniskos atkārtojumus katram no trīs bioloģiskajiem atkārtojumiem, iegūstot deviņus pilienus, kas kopā reprezentē vienu parauga kopu. Plates tika inkubētas +30°C 24h, pēc kurām manuāli tika saskaitītas kvv katrā 5µl pilienā, rezultāti apkopoti MS Office Excel programā.

2.6. Subletālo stresu apstākļu noteikšana

Katram stresam aptuvenās robežas tika meklētas literatūrā. Vadoties no atrastajiem datiem, tika atlasīti stresoru parametri pārbaudīšanai:

oksidatīvajam stresam inkubēšana 10mM H₂O₂, variējot laiku – 10, 30, 50 un 70 min, pēc katra laika punkta sasniegšanas, trīs šūnu paraugi tika divas reizes nomazgāti, veikti vairāku kārtu atšķaidījumi un paraugi uzsēti uz YPD agara platēm ar 2% glikozes sastāvu.

termiskajam stresam variētas tika temperatūras sākot no 50 līdz 55 °C, visās temperatūrās paraugi tika inkubēti 10 min un pēc noteiktā laika, šūnas tika divas reizes nomazgātas, veikti vairāku kārtu atšķaidījumi un paraugi uzsēti uz YPD agara platēm ar 2% glikozes sastāvu.

acetāta stresa gadījumā netika veikta adekvātā stresora punkta pārbaude, bet izvēloties 100mM etiķskābes koncentrāciju un YPD plates pH novests līdz pH 4,5, jo šūnām šāds pH nav bīstams, bet piemērots, lai acetāts būtu nedisociētā formā un spētu difundēt šūnās.

Katra stresa gadījumā ar kontroli tika veiktas tieši tādas pašas darbības – barotņu maiņa, mazgāšana, uzsēšana uz platēm veicot šķaidījumus, bet šūnas netika pakļautas stresam. Visas plates tika inkubētas +30°C 24h, pēc kurām manuāli tika saskaitītas kvv katrā 5µl pilienā, rezultāti apkopoti MS Office Excel programā.

Izdzīvotība pēc stresa tika aprēķināta kā kvv/ml stresam pakļautajām šūnām kvv/ml kontrolei.

2.7. Purīnu pieejamības ietekmes novērtējums uz šūnu stresa izturību

Bakalaura darba laikā tika novērtēts purīnu un oglekļa avota ietekme uz šūnu stresa izturību, tas tika darīts variējot purīnu sastāvu barotnē un oglekļa avotu, izmantojot gan fermentatīvu, gan daļēji fermentatīvu cukuru.

Oksidatīvā stresa gadījumā, 1 OD tika panākts 1 ml šūnas ar optisko blīvumu 1, pilnībā atdalot no šķidrās fāzes un resuspendējot 990µl sterila ūdens, tad suspensijai pievienojot 10µl 30% H₂O₂, lai OD atkal būtu 1. Inkubācija 10mM H₂O₂ notika 50 minūtes, pēc tam šūnas tika divas reizes nomazgātas sterilā ūdenī.

Termo šoka pārbaudes gadījumā, pēc 4h badināšanas etapa (7. att. B), 1 ml šūnu tika nomazgātas un iepildītas 1,5 ml plastmasas stobriņos, lai optiskais blīvums būtu precīzi OD 1 un paraugi inkubēti 10 min 53 °C temperatūrā.

Pēc abiem iepriekšminētajiem stresiem šūnas uzreiz tika divas reizes nomazgātas un tālāk veikts atšķaidījumu tests, vieglākai koloniju saskaitīšanai uz platēm.

Kontroles gadījumā tika izlaista stresa daļa un šūnas pēc nomazgāšanas no barotnēm ar atšķirīgo sastāvu (7. att. B) uzreiz atšķaidītas par vairākām kārtām un uzsētas uz YPD platēm ar 2% glikozi, bet acetāta stresa gadījumā šūnas tika uzsētas uz YPD acetāta platēm ar 2% glikozi.

2.8. Datu apstrāde

Dati galvenokārt tika apstrādāti MS Office Excel programā. Lai iegūtu procentuāli izdzīvojušo šūnu skaitu tika aprēķināts vidējais izdzīvojušo šūnu skaits (aprēķināts izmantojot Excel funkciju "AVERAGE") un paraugu kopas standartnovirze (izmantojot Excel funkciju "STDEV") katrā pozīcijā un salīdzināts tā paša atšķaidījuma izdzīvojušo šūnu skaits pirms un pēc stresa. Iegūstot izdzīvojušo šūnu skaitu pēc stresa, tika aprēķināta relatīvā rezultātu nenoteiktība (1) pēc kvadrātu summas metodes (Bell 1999).

$$\frac{\text{st.novirze izdzīvotībai}}{\text{izdzīvotība}} = \sqrt{\left(\frac{\text{st.novirze kontrolei}}{\text{vidēji kontrolē}}\right)^2 + \left(\frac{\text{st.novirze pēc stresa}}{\text{vidēji pēc stresa}}\right)^2} \quad (1)$$

Formulā 1 iegūto rezultātu rezinot ar izdzīvotību, tiek iegūta ticamības variācija, jeb rezultāta nenoteiktības amplitūda, kas attēlota grafikos ar kļūdu nogriezni. Pārbaudot rezultātu būtiskumu, par būtiskiem rezultāti tika uzskatīti tie, kuru p<0,05. P-vērtība tika noteikta ar Excel programmas funkciju "T.TEST", izmantojot abpusēju testu.

2.9. Īpatnējā augšanas ātruma iegūšana

Lai noskaidrotu kā īpatnējo augšanas ātrumu R5.0 celmam ietekmē barotnē esošais guanīns un adenīns, kā arī to trūkums, paraugi ar R5.0 šūnām tika inkubēti 96 lauciņu PCR platē SD barotnē ar variētu adenīna un guanīna saturu. Optiskais blīvums pie 600nm tika mērīts plašu lasītājā “Infinite 200 Pro” (Tecan). Inkubācija notika ~34°C temperatūrā ar sākuma mērījumi veikti ik pēc 579,2 s. Rezultāti apkopoti programā MS Office Excel. Tā kā gaismas ceļš caur paraugu izmantotajā PCR platē ir daudz īsāks kā kivetē tika veikti aprēķini, lai iegūtu patiesās OD vērtības, tas tika darīts inmantojot 2. formulu.

$$OD = 3,7952 \times (\text{nomērītais } OD)^2 + 2,981 \times \text{nomērītais } OD \quad (1)$$

Katram barotnes sastāvam veikti pieci tehniski atkārtojumi, vidējais rezultāts aprēķināts izmantojot Excel funkciju “AVERAGE” un paraugu kopas standartnovirze izmantojot Excel funkciju “STDEV”, rezultāti attēloti izkliedes grafikā, izmantojot logaritmisko skalu.

2.10. FACS analīze DNS daudzumam šūnās

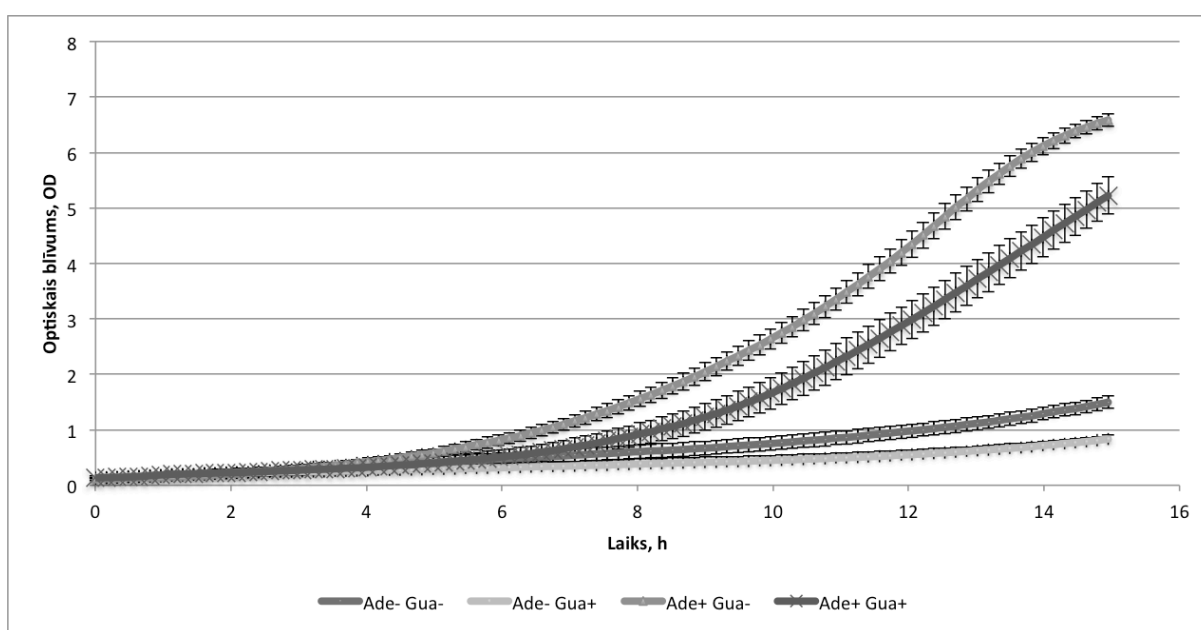
Šūnas tika audzētas pilnā SD barotnē līdz OD ~0,5. Tad tās tika nomazgātas ar sterilu ūdeni, kultūra sadalīta vairākās daļās un šūnas resuspendētas dažādās barotnēs: SD +ura+leu+trp+his vai SD +ura+leu+trp+his+gua ar glikozi vai galaktozi kā oglekļa avotu. FACS paraugi tika paņemti pēc 4,5 h inkubēšanas minētajās barotnēs. 0,5 ml rauga kultūras tika fiksēta vismaz 15 min ar 10 ml ledus aukstu 70% etanolu, pēc 15min šūnas tika nomazgātas 50mM citronskābē. RNS tika noārdīts ar RNāzi A (10 mg L-1) 50mM citronskābē 37oC temperatūrā inkubējot paraugu uz nakti. DNS krāsots ar 10_SYBR Green I 50mM citronskābē 30 minūtes (Looke *et al.* 2013).

3. REZULTĀTI

Šajā darbā tika pārbaudīta adenīna auktrotrofā *S. cerevisiae* celma R5.0 subletālo stresu izturība, adenīna badināšanas apstākļos. Salīdzinājumam visi eksperimenti tika veikti, pārbaudot šo stresu ietekmi uz R5.0 izejas celmu H1346, kura adenīna ražošana nav traucēta un CEN.PK prototrofo celmu, tādā veidā ļaujot novērtēt arī citu iespējamo ietekmi.

Adenīna badināšanas ietekme uz R5.0 specifisko augšanas ātrumu

Tā kā R5.0 “izslēgtais” *ade8* gēns atbild gan par adenīna, gan guanīna ražošanu šūnā, tika veikti eksperimenti, lai novērotu, kā guanīna pievienošana maina adenīna badinātu šūnu augšanu. Rezultāti apskatāmi 8. attēlā.



8.attēls. Augšanas līknes *S. cerevisiae* R5.0 celmam variējot adenīna un guanīna klātbūtni barotnē. Līknes iegūtas paraugus audzējot 96 lauciņu platēs, un optisko blīvumu mērot ar plašu lasītāju “Infinite 200 Pro”, tam ik pēc 579,2 s veicot optiskā blīvuma mērījumus. Attēlā redzams, ka kultūru lag fāze sasniedz 4 h, pēc kurām log fāzē ieiet tikai kultūras, kurām pievienots adenīns.

Figure 8. Growth curve of *S. cerevisiae* strain R5.0 incubated in medium with variable purine content.

Grafikā uzskatāmi redzams, ka šūnu OD (attēlā – kvadrāts, trīsstūris) pieaug lēnāk kā šūnu, kuru barotnē adenīns tika pievienots (attēlā – krusts, aplis). Novērots arī šūnu daudzuma samazinājums, pievienojot guanīnu.

No iegūtajiem datiem, kas redzami 8. attēlā tika aprēķināts specifiskais augšanas ātrums un iegūtie rezultāti redzami 4. tabulā.

S. cerevisiae celma R5.0 specifiskais augšanas ātrums atkarībā no pieejamā purīna barotnē

Table 4

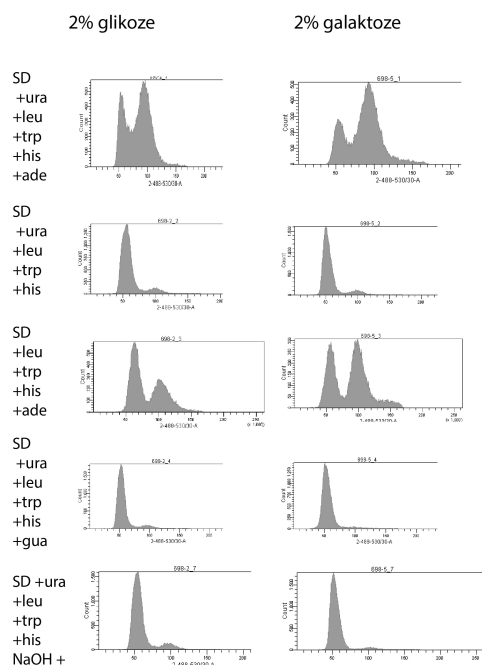
Specific growth rate of *S. cerevisiae* strain R5.0 depending on available purine in medium

Ade- Gua-	Ade- Gua+	Ade+ Gua+	Ade+ Gua-
0,110	0,092	0,240	0,254

Gan 8. attēlā, gan 1. tabulā redzams, ka biomasas pieauguma ātrums samazinājies šūnām bez adenīna, guanīna pievienošana ir negatīvi ietekmējusi šūnu daudzumu. Ozoliņa (2015) raksta, ka adenīna trūkums barotnē izraisa šūnu palielināšanos, kas ietekmē OD mērījumus, tādēļ tika veikta šūnu uzskaitē ar šūnu skaitītāju un konstatēts, ka šūnu skaits adenīna badinātām šūnām pārstāj pieaugt pēc 200 min. Tātad, pēc šīm 200 min OD pieaugums adenīna badinātā kultūrā ir balstīts tikai uz šūnu izmēru palielināšanos. Pēc augšanas līknēm var secināt, ka guanīna pievienošana nespēj kompensēt adenīna trūkumu, tas sakrīt ar 6. attēlā redzamo shēmu, kas rāda, ka šūna nespēj saražot adenīnu no guanīna.

3.1. DNS daudzuma mērījumi R5.0 šūnās

Lai noteiktu vai šūnas arestējās, kad tām trūkst purīnu, tika veikta FACS analīze variējot barotnes sastāvu, DNS daudzuma analīzes rezultāti redzami 9. attēlā.



9. attēls. DNS saturs mērījumi *S. cerevisiae* celmam R5.0 pēc 4,5h šūnu inkubēšanas sintētiskajās barotnēs ar dažādu sastāvu. Pirmajā kolonā redzami dati par šūnām, kas augušas uz 2% glikozes, bet otrajā kolonā par šūnām, kas augušas uz 2% galaktozes. Pirmajā rindā šūnu barotnē tika pievienotas visas to augšanai nepieciešamās vielas – adenīns, uracils, leicīns, triptofāns un histidīns. Rindās no otrajai līdz ceturtajai variēti dažādi auktrotrofie aģenti, bet piektajā rindā SD baroteni nav pievienoti purīni, bet sārms, kurā šķīdināti purīni citiem variantiem.

Figure 9. DNA content in *S. cerevisiae* strain R5.0 cells after 4,5 hr incubation in SD 2% glucose or galactose medium with different purine content. 1st row shows data about cells incubated in full SD medium, in rows two to four auxotrophic agents are varied. Medium without adenine and added NaOH shown in last row

Grafikos, kas redzami 9. attēlā uz X ass attēlots DNS daudzums šūnā, uz Y ass šūnu skaits, 1. rindā abos grafikos redzami divi pīķi – pirmais uzrāda šūnas, kurās ir mazāks DNS daudzums, bet otrais pīķis šūnas ar palielinātu DNS daudzumu, tas reprezentē šūnas, kurās DNS ir replicējies, tātad tās ir šūnas G2 šūnas cikla fāzē. Ja redzami abi pīķi, šūnas dalās normāli. Otrajā rindā redzamas šūnas, kas 4,5 h audzētas barotnē bez adenīna un guanīna. Šajā situācijā redzams tikai viens pīķis, tā kā kultūra nav sinhronizēta, saprotams, ka kultūrā samazinājies šūnu daudzums ar dubultotu DNS daudzumu, tas savukārt norāda uz arestu.

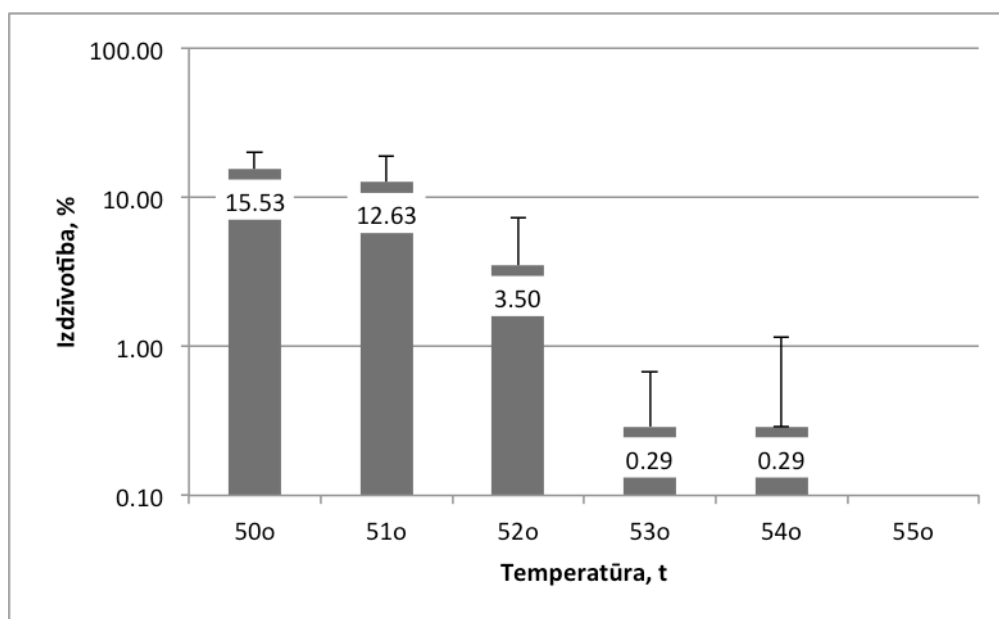
Šūnas ir arestējušās gan uz glikozes, gan galaktozes, tam vajadzētu radīt augstāku izdzīvotību pēc stresa, tā kā zināms, ka arestējušās šūnas to pārcieš labāk. Šūnas arestējušās arī gadījumā, ja barotnei bez adenīna tiek pievienots guanīns. Salīdzinājumam 3. rindā redzams, ka analīzes atkal uzrāda divus pīķus, līdz ar to uracila badinātas šūnas ciklu nearestē.

3.2. Izdzīvotības noteikšana pēc stresa

Sagaidot, ka arestētās šūnas būtu stresa izturīgākas tika veikti eksperimenti, lai noteiktu to izdzīvotību pēc dažādiem stresa apstākļiem, kā jau metodēs tika minēts, sākumā bija nepieciešams atrast stresoru stiprumu un stresa ilgumu pie kura nomirst vismaz 90% šūnu, lai aresta efets būtu labi izteikts. Tālākie eksperimenti veikti pielietojot šos noteiktos stresa parametrus.

3.2.1. Termiskais šoks

Termiskā stresa pārbaudei tika izvēlēts pārbaudīt temperatūras robežās no 50°C līdz 55°C ar rezultātiem iespējams iepazīties 10. attēlā.

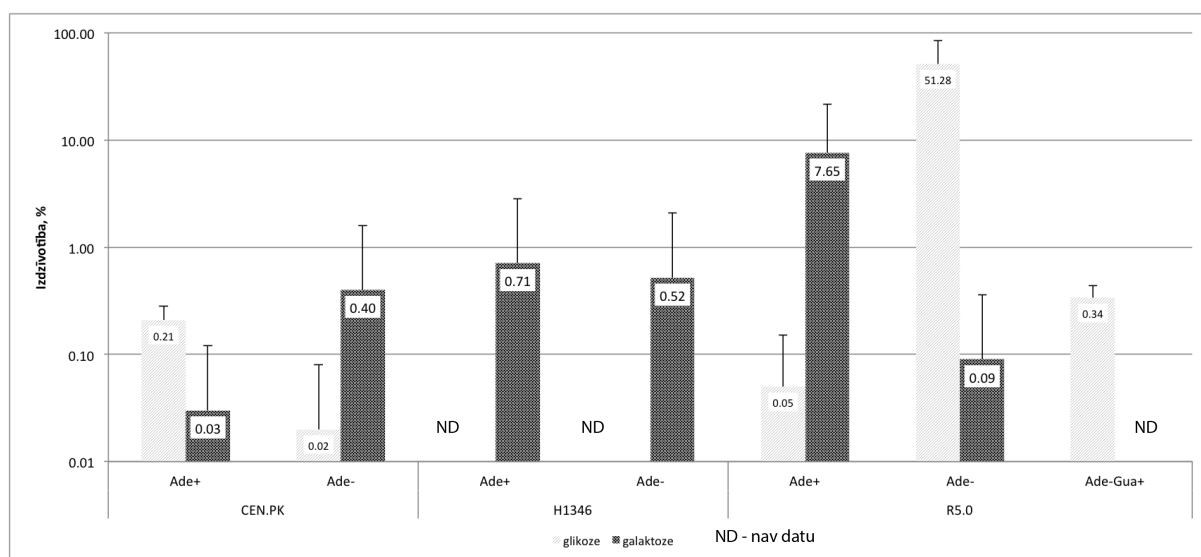


10. attēls. Logoritmiskā skalā attēlota *S. cerevisiae* celma R5.0 izdzīvotība pēc 10 min karsēšanas temperatūrās no 50 līdz 55 °C. Pie 52 °C redzams būtisks ($p < 0,05$) izdzīvotības samazinājums, salīdzinot ar 51 °C, bet pie 55 °C redzams, ka nomirušas visas šūnas.

Figure 10. Graph shows survival rates of *S. cerevisiae* strain R5.0 after 10 min incubation in temperatures from 50 to 55 °C. Graph in logarithmic scale. Statistically significant ($p < 0,05$) decrease of survivability is observed for 52°C

Salīdzinot izdzīvojušo šūnu skaitu starp dažādām temperatūrām, būtisks izdzīvotības kritums tika novērots pie 52°C, tomēr tālākam eksperimentam tika izvēlēts šūnas inkubēt 53 °C temperatūrā, lai rezultāti būtu uzskatāmāki.

Eksperimentā ar visiem trīs celmiem tika veikta karsēšana 53°C temperatūrā, iegūtie rezultāti apskatāmi 11. attēlā. Kā jau tika plānots, lielajā eksperimentā tika variēts gan purīnu sastāvu barotnē, gan oglekļa avots.



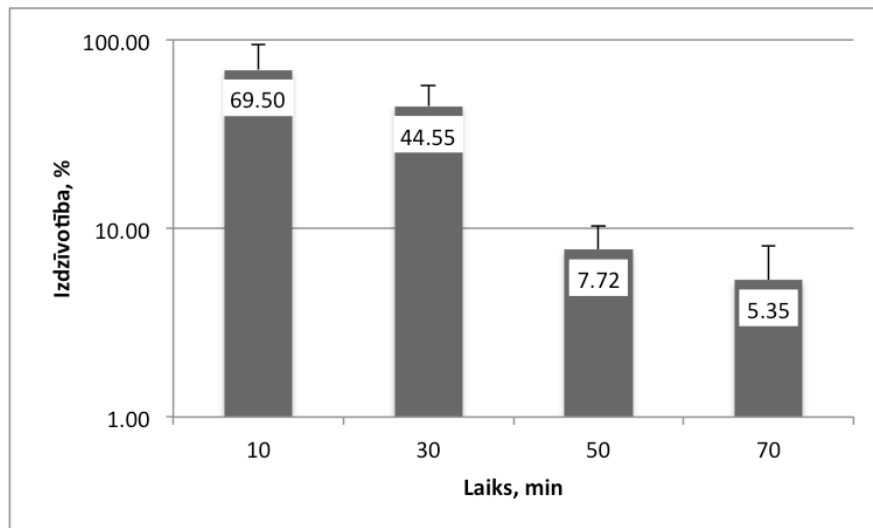
11. attēls. Logaritmiskā skalā attēlota trīs celmu – CEN.PK, H1346 un R5.0 izdzīvotība pēc termiskā šoka (53°C 10 min), audzējot SD barotnē uz atšķirīgiem oglekļa avotiem un atšķirīgu purīnu sastāvu. Ar gaiši pelēku apzīmētas uz glikozes audzētas šūnas, bet ar tumši pelēku uz galaktozes.

Figure 11. All three *S. cerevisiae* strain – CEN.PK, H1346 and R5.0 survival rates after a heat shock (53°C 10 min). Cells grown in SD medium with 2% glucose as a carbon source (light gray) or 2% galactose (dark gray). Graph in logarithmic scale

Kā redzams 11. attēlā, kopumā rauga izdzīvošana pēc subletālā stresa mainās atkarībā no cukura, uz kāda tas ir audzēts, bet R5.0 arī adenīna badināšanas gadījumā, audzējot uz glikozes ir redzama paaugstināta izdzīvotība salīdzinājumā ar pārējiem celmiem, adenīna badinātam R5.0 pievienojot guanīnu, izdzīvotība atkal nokrītās robežās zem 1%.

3.2.2. Oksidatīvais stress

Pārbaudot R5.0 spēju augt vidē ar 10mM H₂O₂ koncentrāciju, pēc 50 min tika novērota tikai 10% populācijas izdzīvotība (skatīt attēlā 12.).

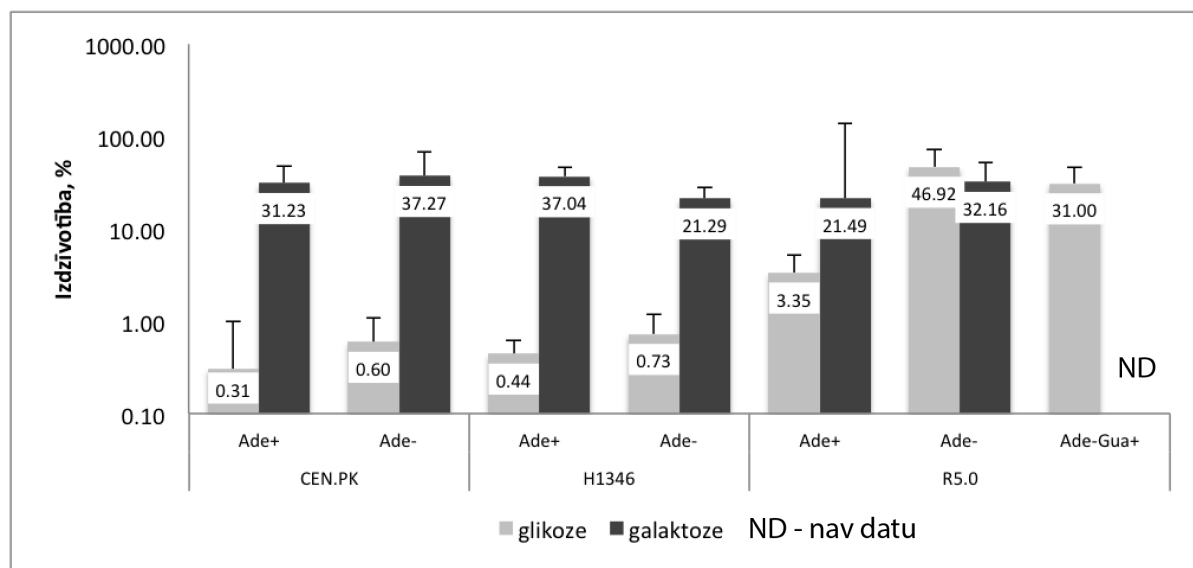


12. attēls. *S. cerevisiae* celma R5.0 izdzīvotības (%), inkubējot 10, 30, 50 un 70 min vidē ar 10mM H₂O₂ koncentrāciju. Dati attēloti logaritmiskā skalā.

Figure 12. *S. cerevisiae* R5.0 survival rate (%) test after incubation in 10mM H₂O₂ medium, incubation time – 10, 30, 50 and 70 min. Graph in logarithmic scale.

Balstoties uz principu, ka darbā tiek pārbaudīta izturība pret subletālo stresu, kad vismaz 90% no sākuma populācijas pēc stresa neizdzīvo, tika nolemts tālākās oksidatīvā stresa pārbaudes veikt, šūnas inkubējot 10mM H₂O₂ 50 min.

Iegūtie rezultāti, veicot eksperimentu ar visiem trīs celmiem un diviem dažādiem oglekļa avota veidiem, attēloti 13. attēlā.



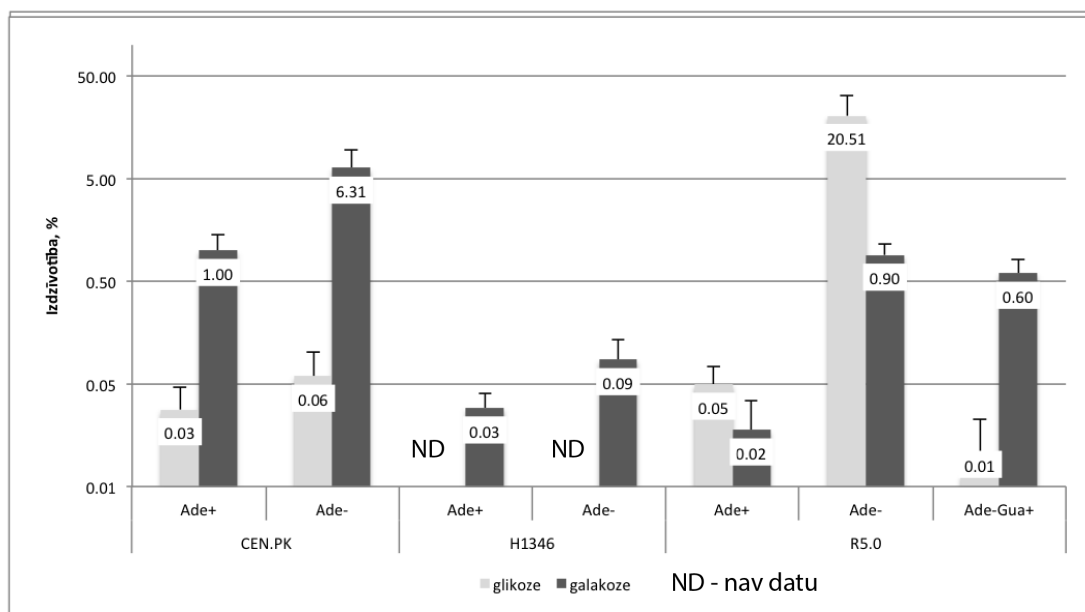
13. attēls. *S. cerevisiae* prototrofā celma CEN.PK, H1346 un R5.0 izdzīvotība pēc 50 min inkubācijas 10mM H₂O₂ attēlota logaritmiskajā skalā. Ar gaiši pelēku apzīmētas uz glikozes audzētas šūnas, bet ar tumši pelēku uz galaktozes.

Figure 13. Survival rates of CEN.PK, H1346 and R5.0 after 50 min incubation in 10mM H₂O₂ medium. Glucose as a carbon source(blue) and galactose(green). Graph in logarithmic scale

Tāpat kā termiskā stresa pārbaudēs, redzams, ka izdzīvotība atkarīga no oglekļa avota uz kāda šūnas audzētas – uz galaktozes audzēto šūnu izdzīvotība svārstās no 21 līdz 37 %, kamēr uz glikozes novērojama būtiski ($p < 0,05$) augstāka izdzīvotība tikai R5.0 celmam, adenīna badināšanas gadījumā. Šūnas, kurās adenīns ir saražots dabiski vai uzņemts no vides izdzīvotība uz glikozes ir robežās no 0,31 līdz 3,35%. Interesanti, Šajā gadījumā R5.0 adenīna badinātām šūnām pievienojot guanīnu, izdzīvotība krītās no 47% uz 31%, tomēr saglabājās augstās izdzīvotības robežās, kas novērojamas arī visu celmu šūnām augot uz galaktozes, to atšķirība nav arī statistiski būtiska.

3.2.3. Acetāta stress

Pēdējais stress, kas tika pārbaudīts ir ilgtermiņa stress, augšanai uz acetāta YPD platēm ar vides pH 4,5. Šajā gadījumā netika meklēts 10% izdzīvotības sliekšnis, bet eksperiments balstīts uz literatūrā atrodamajiem datiem par acetāta ietekmi uz šūnu noteiktā pH apstākļos.



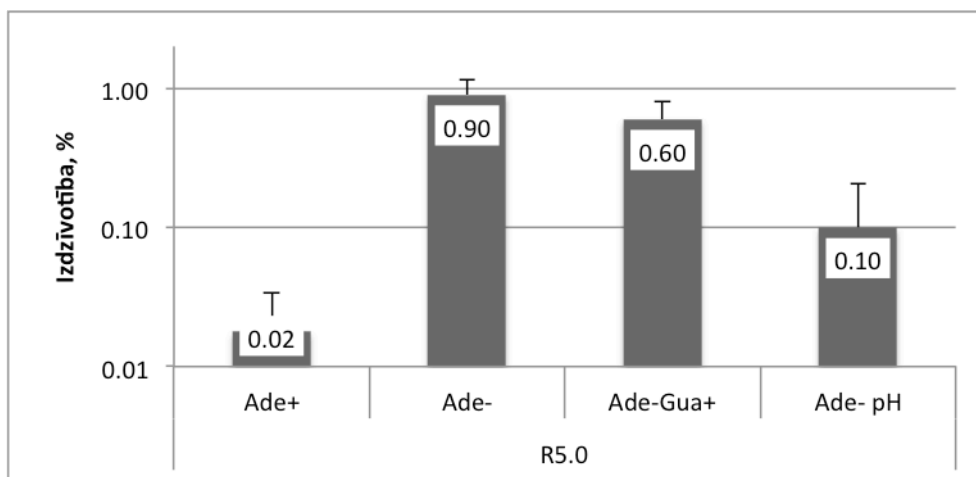
14. attēls. *S. cerevisiae* prototrofā celma CEN.PK, H1346 un R5.0 izdzīvotība, augot uz YPD platēm 100mM etiķskābes koncentrācijā ar vides pH 4,5. Ar gaiši palēku apzīmētas uz glikozes audzētas šūnas, bet ar tumši pelēku uz galaktozes. Dati attēloti logaritmiskā skalā.

Figure 14. *S. cerevisiae* CEN.PK, H1346 and R5.0 survival rates after growth on 0,1M acetic acid YPD agar plates with pH 4,5. Glucose as a carbon source(light gray) and galactose(dark gray). Graph in logarithmic scale.

Attēlā 14. redzams, ka tāpat kā oksidatīvā un termiskā stresa apstākļos arī šajā gadījumā, saglabājās tendence lielākajai izdzīvojušās populācijas daļai sākuma oglekļa avots ir bijis galaktoze, tomēr realitātē šī starpība nav būtiska. Ievērojama starpība izdzīvojušo šūnu daudzumā atkal novērojama šūnām, kas ir adenīna badinātas, šoreiz R5.0 celma izdzīvotība ir vismaz trīs reizes augstāka kā pārējiem celmiem, t.i. 20%.

3.3. Sārma ietekme uz izdzīvotību paragos, kur pievienots Gua

Novērojot, ka paraugos, kuros pievienots guanīns, bet trūkst adenīna izdzīvotība samazinās, tika veiktas pārbaudes, eksperimenta laikā pievienojot papildus R5.0 paraugus, kuriem netika pievienots adenīns, bet pasārmināta vide līdz tādai, kāda ir paraugos, kur pievienots guanīns. Šūnas tika sētas uz acetāta platēm, lai novērotu kā sārmaināka vide ietekmē šūnu izdzīvotību. Rezultāti redzami 15. attēlā.



15. attēls. *S. cerevisiae* R5.0 celma izdzīvotība (%), augot uz agarizētām YPD 100mM etiķskābes platēm ar pH 4,5. Dati attēloti logaritmiskā skalā.

Figure 15. Survival rates (%) after growth on YPD agar 100mM acetic acid plates with pH 4,5. Data shown in logarithmic scale.

Redzams, ka būtiska atšķirība pastāv tikai starp paraugu, kas audzis barotnē ar adenīnu un pārējiem paraugiem, pH paraugam nav statistiski būtiskas atšķirības no adenīna badinātajiem paraugiem bez un ar guanīnu.

3.4. Izdzīvotības pārskats

Lai visus iegūtos rezultātus saistībā ar izdzīvotību pēc stresa apstākļiem varētu viegāk pārskatīt, tie apkopoti 5. tabulā, izmantojot iegūtos datus par R5.0 celma izdzīvotību atkarībā no variētā barones sastāva.

5. tabula.

Izdzīvotība (attēlotie skaitļi ir % izteikta izdzīvotība) pēc katra pārbaudītā stresa, atkarībā no oglekļa avota, pievienotā purīna (1. rinda) un purīnu sastāva šūnā (melns), kas ticis sintezēts no pievienotā purīna.

Table 5

Survival rates (numbers in table are % of cells survived after stress compared to cells with no stress) after each stress depending on carbon source, added purine (1st row) and purine contents in cell (black) synthesized from added purine.

Stresa veids/ pievienotais purīns	Ade+	Ade-	Gua+
glikoze	Ade+ Gua+	Ade- Gua-	Ade- Gua+
acetāts	0,05	20,51*	0,01
termošoks	0,05	51,28*	0,34
peroksīds	3,35	46,92*	31*
galaktoze			
acetāts	0,02	0,9	0,6
termošoks	7,65	0,09	n/d
peroksīds	21,49	32,16	n/d

* - būtiska ($p < 0.05$) atšķirība salīdzinot ar Ade+

Tabulā 2. redzams, ka neskatoties uz to, ka šūnas arestējušās arī augot uz galaktozes (FACS rezultāti), izdzīvotība adenīna trūkumā nav bijusi augstāka par 1%. Tālāk diskusijas nodaļā tiks apspriests kāpēc iegūtie rezultāti varētu būt šādi, ne pilnīga izdzīvotības paaugstināšanās visos gadījumos, kad šūnas badinātas.

4. DISKUSIJA

Jau iepriekš institūta pētījumos Ķibilds, Ozoliņa, Kokina novēroja, ka adenīna trūkums arestē šūnas ciklu, bet zināms, ka arests šūnas padara izturīgākas (Werner-Washburne 1996).

Šajā bakalaura darbā tika pārbaudīta Maizes rauga subletālo stresu izturība, atkarībā no purīnu pieejamības šūnās.

Papildus tika veiktas pārbaudes audzējot šūnas uz diviem dažādiem oglekļa avotiem – glikozes un galaktozes. Šie cukuri izvēlēti, jo glikozi raugs spēj fermentēt (anaerobi), savukārt galaktoze tiek metabolizēta raugam elpojot. Pie elpošanas aktivācijas oksidatīvā stresa aizsardzības mehānismi. Literatūras dati liecina, ka oksidatīvā stresa komponente ir visos trīs darbā izmantotajos stresos.

Rezultātos redzams kā rauga šūnas izdzīvotību ietekmē gan purīnu sastāvs barotnē, gan oglekļa avots tajā. Izvērtējot kā šūnas izdzīvotību ir mainījusi **adenīna** klātesamība tajā, redzams, ka visās stresa pārbaudēs, audzējot šūnas uz glikozes, novērots ievērojams izdzīvotības pieaugums šūnām, kurām adenīns nebija pieejams. Tas ļauj secināt, ka adenīna trūkums uz glikozes palielina šūnu izdzīvotību. Kā iepriekš darbā minēts, *S. cerevisiae* no adenīna sintezē arī guanīnu, kas savā fosfātu formā tāpat kā adenīns piedalās šūnas signālceļu darbībā, piemēram, šūnai signalizējot par glikozes pieejamību ārvidē (Conrad *et al.* 2014). Tāpēc šajā darbā tika iekļauts barotnes variants, kurā adenīna vietā tiek pievienots guanīns, tā ļaujot noteikt, kura purīna trūkums nosaka izturību pret noteiktajiem subletālā stresa apstākļiem.

Klosinska *et al.* (2011) norāda, ka badinot šūnas uz jebkāda svarīga barības elementa, ar laiku tām iestājas miera stāvoklis, kad tās līdzinās stacionārās fāzes šūnām, rezultātā tās ir izturīgākas pret dažādiem stresiem. Lai gan teorētiski arestētās šūnas izdzīvo labāk, šī darba rezultātos redzams, ka uz galaktozes audzētās šūnas bez adenīna ir arestējušas šūnas ciklu, bet izdzīvotība nepalielinās. Tāpat arī purīnu variācija ir mainījusi šūnu dzīvotspēju pēc subletālo stresu apstākļiem. Dažādiem stresa veidiem oglekļa avots un purīna sastāva variācija noved pie atšķirīgiem izdzīvotības rezultātiem.

Tālākajās nodaļās apskatīts kādas izmaiņas šūnās varētu būt izraisījušas novērotās stresa izturības.

4.1. Barotnes sastāva ietekme uz šūnas izdzīvotību

4.1.1. Pēc oksidatīvā stresa

Šajā darbā iegūtajos rezultātos redzamas divas galvenās tendences – šūnas, kas augušas uz galaktozes ir izturīgākas pret oksidatīvā stresa ietekmi, salīdzinot ar uz glikozes augušām šūnām, un šūnas, kuru barotnei nav ticis pievienots adenīns izdzīvo vislabāk pēc subletālā stresa. Izdzīvotība uz galaktozes audzētām šūnām oksidatīvā stresa laikā izskaidrojama ar mehānismiem ar kuriem šūna cīnās pret brīvajiem radikāļiem, kad tā aug uz nefermentējama oglekļa avota, piemēram, superoksīddismutāzi 1 (SOD1), kas aktivējas tieši uz nefermentējama oglekļa avota (Breitenbach *et al.* 2012), tādejādi šūnā, kurā jau ir mehānismi ar kuriem cīnīties pret nevēlamajiem radikāļiem ir lielākas izredzes izdzīvot oksidatīvā stresa apstākļos.

Šī paša oksidatīvā stresa laikā novērojama arī adenīna badināto šūnu paaugstināta izdzīvotība pēc stresa. Ozoliņa (2014) savā bakalaura darbā ir pētījusi arī elpošanas intensitāti adenīna badinātām šūnām un rezultāti uzrādījuši pastiprinātu elpošanas intensitāti. Viens no iemesliem, kāpēc šūnas bez adenīna elpo intensīvāk varētu būt nepilnvērtīga glikozes pieejamības signāla padošana šūnā, ja glikoze ierosina PKA darbību un šūnā sāk pieaugt cAMP daudzums, tad adenīna trūkuma gadījumā cAMP daudzums būs neproporcionāls glikozes daudzumam. Teorētiski pie 20g L⁻¹ glikozes koncentrācijas arī aerobos apstākļos šūnai vajadzētu pārstāt elpot un sākt fermentēt pieejamo glikozi (Fugelsang, Edwards 2007). Ja glikozes koncentrāciju šūna nosaka pēc cAMP daudzuma, pie tā samazinātas koncentrācijas neiestājās krebrī efekts un šūna aerobos apstākļos turpina elpot.

4.1.2. Pēc karstuma šoka

Tāpat samazināts cAMP daudzums pozitīvi ietekmē hsp sintēzi, līdz ar to samazinātas cAMP koncentrācijas rezultātā šūnā tika intensīvāk sintezēti hsp, kas atkal ļāva šūnām sagatavoties stresa apstākļiem, pirms tās tika tiem pakļautas. Tāpat arī termošoka rezultātā šūnās rodās dažādi radikāļi un atkal cīņai ar tiem var palīdzēt oksidatīvā stresa signālmehānismi, kas aktivējušās tāpat kā oksidatīvā stresa gadījumā. Karstuma šoka gadījumā novērojams, ka adenīna badinātajām šūnām pievienojot guanīnu, to izdzīvotībā novērojams samazinājums no 51,28 % uz 0,34 %. To var izskaidrot divos veidos. Pirmais – tā kā guanīns tika šķīdināts 0,1M KOH, tā pievienošana mainīja vides pH. Nomērot barotnes pH tika konstatēts, ka pH mainījies no 4 uz 7. Otrais skaidrojums – purīnu badināšanas gadījumā ir guanīna iztrūkums šūnā, kas ietekmē guanīna signālu pārvadi (Conrad *et al.* 2014). *S.*

cerevisiae termotolerance ir visaugstākā, kad ārējās vides pH ir sasniedzis 4 (Walker 2000). Lai gan pirms pakļaušanas termo šokam šūnas tika nomazgātas un pārvietotas uz vidi ar destilētu ūdeni, kur pH ~5, nevar apgalvot, ka tam nav bijusi nekāda ietekme salīdzinot ar adenīna badinātām šūnām.

4.1.3. Pēc etiķskābes stresa

Acetāta stresa gadījumā, redzama aptuveni divas reizes mazāka izdzīvotība kā oksidatīvā stresa apstākļos, tas varētu būt iespējams, jo šūnā sākuši darboties apoptotiskie marķieri. Izvēloties pie kādas etiķskābes koncentrācijas pārbaudīt tās ietekmi uz badinātām *S. cerevisiae* šūnām kā kritērijs tika vērtēts izdzīvojušo šūnu proporcija, bet netika ņemts vērā, ka pie 100mM etiķskābes koncentrācijas šūna varētu iedarbināt pašiznīcināšanos. Turklāt auksotrofijas kopumā negatīvi ietekmē izdzīvotību acetāta stresa gadījumā (Ding *et al.* 2013).

Ja termiskā stresa laikā pievienotais guanīns mainījis rezultātus iespējams dēļ augstāka pH, tad acetāta gadījumā tam vajadzētu pozitīvi ietekmēt šūnas izdzīvotību, jo etiķskābe vairs nebūtu bīstama šūnai disociētā formā. Tā kā zināms, ka Ras aktivē PKA ar vides paskābināšanu, iespējams tur slēpjas kāds neizpētīts mehānisms kā šūnā palielināts cAMP daudzums varētu palīdzēt cīņā ar H^+ protoniem, lai gan tas būtu pretrunā ar to, ka H^+ pumpējot ārā no šūnas tiek izmantots ATF, tāpat kā cAMP sintēzei, tas nozīmē, ka šie būtu divi konkurējoši ATF izmantošanas mehānismi. ATF varētu būt iemesls, kāpēc adenīna klātbūtnē izdzīvotība pēc šī stresa ir labāka – jo šūnai pieejams vairāk ATP, lai izvadītu liekos H^+ , kas tikai paskābina šūnas iekšējo vidi.

4.2. Turpmākie pētījumi

Jāņem vērā, ka nepieliekot barotnei adenīnu, nevar droši apgalvot, ka šūnā adenīns nav uzkrājies no iepriekšējās kultivācijas (skatīt 7. attēla A fāzi), jo kā Kokina *et al.* (2014) norāda – adenīna auksotrofās šūnās adenīns tiek uzkrāts vairāk kā prototrofu celmu šūnās. Pārvietojot adenīna auksotrofās šūnas uz jaunu sintētisko barotni, kurā netiek pievienots adenīns, iespējams, ka šūnās ir vairāk adenīna kā prototrofajās, tādēļ būtu nepieciešams izmērīt adenilātu daudzumu šūnās pirms to pakļaušanas stresam.

Savukārt, kā norāda Ozoliņa (2015) savā bakalaura darbā, šūnām bez adenīna auksotrofijas pēc 4 stundām, ATF koncentrācija ir aptuveni 4 mmol L^{-1} , turpretī adenīna auksotrofajās šūnās ATF daudzums ir 1 mmol L^{-1} .

Varētu pārbaudīt vairākus stresus, piemēram, etanola stresu vai osmotisko stresu, kas nav saistīts ar oksidatīvo stresu, tā aptverot plašāku stresu paneli. Tālākus pētījumus varētu veikt ar iekššūnas metabolītu sastāvu analīzes, audzējot raugu uz dažādiem oglekļa avotiem un ar atšķirīgu purīna sastāvu barotnēs. Tādējādi nosakot vai ir ievērojamas metabolītu izmaiņas un ATP/GTP proporciju, variējot barotnes sastāvu tāpat kā šajā darbā.

Lai panāktu labāku datu salīdzināmību, stresoru stiprumu un stresa ilgumu vajadzētu visiem stresiem izvēlēties tādu, lai panāktu noteiktu populācijas daļas bojāeju. Šajā darbā galvenais kritērijs bija šūnu izdzīvotība $< 10\%$, tomēr datu salīdzināmībai labāk būtu izvēlēties $5\% \pm 1\%$ un visus eksperimentus veikt ar adekvātu stresora stiprumu un inkubēšanas laiku.

SECINĀJUMI

1. Adenīna trūkums barotnē izraisa adenīna auktrofo šūnu arestu G1 fāzē. Guanīna pievienošana šūnu arestu nenovērš.
2. Adenīna badošanās laikā pieaug rauga *S. cerevisiae* oksidatīvā, termiskā un vāju skābju stresa izturība, ja šūnas audzē uz glikozes
3. Augot uz oksidatīvi fermentatīva substrāta pieaug oksidatīvā stresa izturība, bet netiek ietekmēta termiskā un vāju skābju stresa izturība. Izturības pieaugums ir līdzvērtīgs adenīna badošanās izturībai .
4. Pievienojot guanīnu zūd adenīna badināto šūnu vāju skābju un termiskā stresa izturība. Oksidatīvā stresa izturība netiek ietekmēta.
5. Adenīna badošanās izraisītā stresa izturība nav izskaidrojama tikai ar šūnu arestu vai palielinātu elpošanu, rezultāti norāda uz signālceļu iesaisti izturības fenomenā.

PATEICĪBAS

Vēlos pateikties savai darba vadītājai par informatīvu un praktisku atbalstu darba izstrādē, Jānim Liepiņam par palīdzību un konsultācijām raugu fizioloģijas jautājumos.

Paldies Armanda Vīganda un Ulda Kalnieka laboratorijām par palīdzību ar tehnisko nodrošinājumu. Tartu Universitātes molekulārās bioloģijas un šūnu bioloģijas institūta laboratorijas profesoram Arnold Kristjuhan par sniegtajām FACS analīzēm.

Paldies arī Zanei Ozoliņai, Evelīnai Puzo un Katrīnai Neiburgai par palīdzīgu roku laboratorijas darbos.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Anonymus 2016 Genome Inventory. www.yeastgenome.org/genomesnapshot
2. Baumanis V., Krūmiņa A. 2015 Eikariotu šūnu bioloģija 543 lpp/350-53. RSU, Rīga
3. Bell S. 1999. A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement. Crown, United Kingdom. 41pp
4. Berg J., Tymoczko J. L., Stryer L. 2002. Biochemistry, 5th edition. New York, W H Freeman 1515pp
5. Bertoli C., Skotheim J., Bruin R. *et al.* 2013 Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 14(8): 518–528 pp
6. Brock T. D, Madigan M. T. 1988. Biology of Microorganisms, New Jersey: Prentice hall international, inc., 835 pp.
7. Breitenbach M., Jazwinski S. M., Laun P. 2012. Aging reaserch in yeast. Springer Science+Business Media B.V. 365pp
8. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H. H., Burgdorf W. H. C. 2000 Dermatology 2nd Edition. Springer, Italy 1817pp
9. Busti S. 2010. Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors* 10(6): 6195-6240pp
10. Çakar Z. P., Sauer U., Bailey J. 1999. Metabolic engineering of yeast: the peris of auxotrophic host. *Biotechnology Letters* 21(7):611-616pp
11. Campbell P. N., Smith A. D., Peters T. J. 2005. Biochemistry illustrated 5th edition. Elsevier limited, China 242 pp
12. Casey E., Sedlak M., Ho N. 2010. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Research FEMS.* 10(4):385-393
13. Conrad M., Schothorst J., Kankipati H. N., Van Zeebroeck G., Rubio-Teixeira M., Thevelein, Johan M. 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology reviews FEMS* 38(2): 254-299pp
14. Crous P. W., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z., Samson R. A.(ed.) 2009. Fungal Biodiversity, the Netherlands, Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre 269 pp. [de Coock A.W.A.M., Gueidan C., de Hoog G. S., Walther G., de Gruyter J., Dijksterhuis J., Stalpers J. A., Groenwald M., Smith M. Th., Beekhout T., Eberhardt U., Robert V.,]

15. Ding J., Bierma J., Smith M. *et al.* 2013. Acetic acid inhibits nutrient uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: auxotrophy confounds the use of yeast deletion libraries for strain improvement. *Applied Microbial and Cell physiology*. 97(16):7405-7416pp
16. Esther Jr. C., Dohlman H. *et al.* 2009 Similarities between UDP-Glucose and Adenine Nucleotide Release in Yeast. *Biochemistry* 47(35): 9269–9278pp
17. Glazer A. N., Nikaido H. 2007. *Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology*. Cambridge university press 463.pp.
18. Giannattasio S., Guaragnella N., Ždravlević M., Marra E. 2013. Molecular mechanisms of *sacharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Frontiers in Microbiology*. 4(33):1-7pp
19. Gibson B. R., Lawrence S., Boulton C. *et al.* 2008. The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. *FEMS yeast research*. 8(4):574-585pp
20. Gomes P. 2007. Low auxotrophy-complementing amino acid concentrations reduce yeast chronological life span. *Mechanisms of Ageing and Development* 128: 383–391pp
21. Griotti A. W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid research* 39:1529-1542pp.
22. Fugelsang K.C., Edwards C.G. 2007. *Wine microbiology* 2nd ed. Springer Science+Business media, LLC 293 pp.
23. Kokina A., Kibilds J., Liepiņš J. 2014. Adenine auxotrophy - be aware: Some effects of adenine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* strain W303-1A. *FEMS Yeast Research*. 14(5): 697-707 pp
24. Lew D.J., Reed S.I. 1995. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Current Opinion in Genetics and Development* 5:17-23pp
25. Ludovico P., Sousa M., Silva M, Leao C., Corte-Real M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147(9): 2409-2415pp
26. Madeo F. 1999. Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *JCB* 145(4): 757-767pp
27. Lõoke M., Kristjuhan K., Värvi S., Kristjuhan A. 2014. Chromatin-dependent and -independent regulation of DNA replication origin activation in budding yeast. *EMBO reports* 14: 191-198pp
28. Mager W.H., Ferreira P.M. 1993. Stress response of yeast. *Biochem J*. 290(1):1-13pp

29. Morano K. A., Grant C. M., Moye-Rowley, W. S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190(4): 1157-1195pp
30. Piper P.W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiology Letters* 134(2-3):121-127pp
31. Pronk J.T. 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2095-2100 pp.
32. Priest F. G., Campbell I. (ed.) 2003. *Brewing Microbiology* 3rd edition. (Chapter: Yeast genetics Hammond J. R. M.) New York: Kluwer academic, 399 pp.
33. Saint-Marc C., Pinson B., Couplier F. *et al.* 2009. Phenotypic Consequences of Purine Nucleotide Imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 183(2): 529–538 pp.
34. Shi L., Tu B.P. 2013 Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin *CLN3* to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 110(18): 7318–7323 pp.
35. Schlegel H.G. 1995. *General Microbiology* 7th ed. Cambridge university press, 655 pp.
36. Schroer T. A. 2005. MOLECULAR MECHANISMS OF CELL CYCLE PROGRESSION pieejams internetā:
http://www.pha.jhu.edu/~ghzheng/old/webct/note7_3.htm
37. Tamanoi F. 2011 Ras Signaling in Yeast. Ed. Santos E. *Genes & Cancer* 2(3): 210–215 pp.
38. Tamanoi F., Walsh M., Katoka T. *et al.* 1984 A product of yeast RAS2 gene is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(November): 6924–6928.
39. Taherzadeh, M.J., Niklasson C., Liden G. 1997. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ? *Chemical Engineering Science* 52(15):2653-2659 pp.
40. Timson D.J. 2007. Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*. 63-71pp.
41. Todar K. 2012. *The Growth of Bacterial Population*. textbookpfbacteriology.net
42. Tortora G.J., Funke B.R., Case C. L. 1989. *Microbiology. An introduction*, Redwood City, Calif: Benjamin/Cummings Pub. Co., 810 pp.
43. Zaikov G. E. 2007 *Biotechnology and Industry*. Nova science publishers, New York 113 pp.

44. Walker G.M. 2000 *Yeast. Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. 350 pp.
45. Werner-Washburne M., Braun E., Crawford *et al.* 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*. 19(6):1159-1166pp
46. Welch A., Gibney P., Botstein D. *et al.* 2013. TOR and RAS pathways regulate desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 24(2):115-128pp
47. Whiting G.C. 1976 Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages – a review. *Journal of The Institute of Brewing* 82:84-92.pp.
48. Wood M.D. & Sanchez Y. 2010 Deregulated Ras signaling compromises DNA damage checkpoint recovery in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* 9(16): 3353–3363pp

Bakalaura darbs „Purīnu auksotrofijas ietekme uz maizes rauga *S. Cerevisiae* subletālo stresu izturību” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Ilze Vamža

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Maģ. biol. Agnese Kokina

Recenzents: asoc. prof., Dr.biol. Pēteris Zikmanis

Darbs iesniegts Latvijas universitātes Bioloģijas fakultātē

Dekāna pilnvarota persona:

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē 13.06.2016.

Komisijas sekretāre: