

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJU KATEDRA

bakalaura darbs

**MAIZES RAUGA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
PURĪNU AUKSOTROFIJAS IETEKME UZ MITOHONDRIJU
METABOLISMU**

Vārds, uzvārds: Anitra Zīle

Studentu apliecības numurs: az19078

Darba vadītāji: Mg.biol. Zane Ozoliņa & Dr.biol. Jānis Liepiņš

Recenzents: Dr.biol. Reinis Rutkis

Rīga

2022

KOPSAVILKUMS

Darba ietvaros pētīta purīnu biosintēzes ceļa saistība ar mitohondriālo metabolismu. Veikta purīnu biosintēzes mutantu kultivēšana dažādu oglekļa avotu, kā arī mitohondriālo procesu inhibitoru klātbūtnē gan šķidrā barotnē, gan uz agara platēm. Tāpat šajā darbā mērīta trīs Krebsa cikla enzīmu aktivitāte.

Novērots, ka pielāgošanās ātrums fermentatīvo substrātu maiņas gadījumā ir atkarīgs no iepriekšējiem augšanas apstākļiem - badinātām purīnu auksotrofu šūnu kultūrām novērota augstāka pielāgotība nekā pilnajā barotnē augušajām. Iegūtie rezultāti norāda, ka purīnu *de novo* sintēzes ceļa mutācijas ietekmē mitohondriju metabolismu.

ade2 un *ade6* mutantiem novērotas izmaiņas oglekļa metabolismā, kas nav raksturīgas citiem auksotrofiem, bet *ade16ade17* atgādina *petite* celmus.

Atslēgasvārdi: purīnu auksotrofija, mitohondriji, šūnu elpošana, Krebsa cikls.

SUMMARY

This study investigated the purine biosynthesis pathway's connection to mitochondrial metabolism. Cultivations of purine biosynthesis mutants with different carbon sources and mitochondrial inhibitors were done in both liquid and agarized media, as well as the activity of three Krebs cycle enzymes, was measured.

It was observed that the adaptability rate when a fermentative substrate is changed depends on the previous growth conditions - starved purine auxotrophic cells showed higher adaptability than the one grown in complete media. Results show that purine *de novo* synthesis pathway mutations affect mitochondrial metabolism.

ade2 and *ade6* mutants displayed changes in carbon metabolism that are not characteristic of other auxotrophs but *ade16ade17* depicts *petite* yeast strains.

Title: Purine auxotrophy's impact on mitochondrial metabolism in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords: purine auxotrophy, mitochondria, cellular respiration, TCA cycle.

SATURS

Ievads	6
Apzīmējumi.....	7
1. Literatūras apskats.....	8
1.1. Maizes rauga raksturojums	8
1.2. Raugu augšana	8
1.3. Pielāgotība.....	10
1.3.1. Pielāgotības eksperimentālā noteikšana.....	12
1.4. Maizes rauga fizioloģija.....	13
1.4.1. Purīnu biosintēzes ceļš	13
1.4.2. Purīnu biosintēzes ceļa regulācija	15
1.4.3. Mitohondriju metabolisms.....	16
1.4.4. Krebsa cikls	17
1.4.5. Mitohondriju elektronu transporta ķēde.....	19
1.4.6. Folātu cikls.....	22
2. Materiāli un metodes.....	24
2.1. Raugu celmi	24
2.2. Reaģenti	25
2.3. Iekārtas un programmatūra	27
2.4. Augšanas līkņu iegūšana mikroplašu lasītājā inhibitoru klātbūtnē.....	28
2.4.1. Augšanas līkņu datu apstrāde	30
2.5. Makrokoloniju augšanas dinamikas noteikšana.....	30
2.6. Enzīmu aktivitātes noteikšana ar INT formazānu.....	31
2.6.1. Šūnu suspensijas un reakcijas maisījuma sagatavošana.....	31
2.6.2. Enzīmu aktivitātes mērījumi un datu apstrāde	32
3. Rezultāti	34
3.1. Alternatīvo oglekļa avotu patēriņš	34
3.2. Augšana mitohondriālā inhibitoru klātbūtnē	37
3.3. Koloniju kultivēšana un augšanas dinamikas reģistrēšana	39

3.4.	Krebsa cikla enzīmu aktivitāte	41
4.	Diskusija.....	43
4.1.	Purīnu mutācijas paātrina alternatīvā C avota izmantošanu	43
4.2.	Nātrija valproāta un metformīna radītie efekti.....	46
4.3.	<i>ade6/2</i> mutācijas palielina <i>S. cerevisiae</i> pielāgotību O ₂ limita apstākļos.....	48
4.4.	Purīnu biosintēzes ceļa saistība ar mitohondrija metabolismu	53
5.	Secinājumi.....	55
	Pateicības.....	56
	Literatūras saraksts.....	57
	Pielikumi	

IEVADS

Purīnu auktrotrofijas ir dabā plaši izplatītas. Tās raksturīgas dažādiem parazītiem, piemēram, malārijas plazmodijiem un leišmānijām, kā arī - atsevišķām vēža šūnu līnijām. *S. cerevisiae* ir plaši izmantots modeļorganisms gan ģenētikā, bioķīmijā, gan sistēmbioloģijā (Sherman, 2002). Pateicoties augstai ģenētiskajai līdzībai cilvēkam, maizes raugu plaši izmanto arī slimību mehānismu pētījumos (Khurana et al., 2010).

Laboratorijā iepriekš iegūtie rezultāti norāda, ka *S. cerevisiae* adenīna auktrotrofiem celmiem varētu būt izmainīta elpošana. Šūnu elpošana norit mitohondrijā. Purīnu biosintēzi ar mitohondriju saista tetrahidrofolāta cikls, kā arī vairāki sintēzei nepieciešamie metabolīti tiek sintezēti vai patērēti tieši šajā organoīdā. Mūsu darba hipotēze ir, ka purīnu auktrotrofiem raugiem piemīt atsevišķas, ar šūnu elpošanu saistītas adaptācijas, kuras noteiktos apstākļos dod izdzīvošanas priekšrocības salīdzinot ar prototrofu. Šī bakalaura darba ietvaros mēģināts noskaidrot, kā purīnu biosintēzes ceļš ir saistīts ar šūnas elpošanu un vai eksistē apstākļi, kuros adenīna auktrotrofi demonstrē augstāku pielāgotību.

Novērojot purīnu auktrotrofu fenotipus dažādos apstākļos, varētu noskaidrot, kāds ir mehānisms, kas saista purīnu biosintēzes ceļu ar mitohondriju. Tāpat iegūtie rezultāti palīdzētu saprast, kādas ar mitohondriju saistītās vielmaiņas īpatnības, bez purīnu auktrotrofijas, vēl piemīt organismiem ar traucētu purīnu sintēzi.

Darba mērķis: raksturot purīnu sintēzes ceļa mutāciju ietekmi uz maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* mitohondrija metabolismu.

Lai sasniegtu mērķi, izvirzīti **darba uzdevumi:**

1. Pārbaudīt purīnu ceļa mutāciju ietekmi uz oksidatīvo substrātu patēriņu;
2. Pārbaudīt purīnu ceļa mutāciju ietekmi uz celmu augšanu;
3. Pārbaudīt purīnu ceļa mutāciju ietekmi uz Krebsa cikla enzīmu aktivitāti.

APZĪMĒJUMI

- ADP** – adenozīna difosfāts
- AICAR** – 5-amino-1-(5-fosfo-D-ribozil)-imidazol-4-karboksiamidoribonukleotīds
- AIR** – aminoimidazola ribonukleotīds
- AMP** – adenozīna monofosfāts
- ATP** – adenozīna trifosfāts
- CAIR** – karboksilamino imidazola ribonukleotīds
- CN** – cianīdi
- DH** – dehidrogenāze
- DMSO** – dimetilsulfoksīds
- DNA** – dezoksiribonukleīnskābe (angl. – *deoxyribonucleic acid*)
- dpi** – punkti collā (angl. – *dots per inch*)
- DW** – sausais svars (angl. – *dry weight*)
- FADH₂** – dihidroflavīna adenīna dinukleotīds
- FAICAR** – formilaminoimidazola karboksamīdribonukleotīds
- FGAM** – formamido-fosforibosilacetamīda
- FGAR** – formilfosforibozilglicīnamīns
- g** – brīvās krišanas paātrinājums, 9,81 m s⁻²
- GAR** – fosforibozilglicīnamīns
- Gln** – Glutamīns
- HCl** – sālskābe
- IMP** – inozīna monofosfāts
- INT** – iodonitrotetrazolija hlorīds (angl. – *iodonitrotetrazolium chloride*)
- YP** – rauga-peptona barotne (angl. – *yeast-peptone media*)
- YPD** – rauga-peptona-dekstrozes barotne (angl. – *yeast peptone dextrose media*)
- kb** – kilobāzes (angl. – *kilobases*)
- LHON** – Lēbera iedzimtā optiskā neiropātijā (angl. – *Leber Hereditary Optic Neuropathy*)
- LU MBI** – Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts
- MAT** – dzimuma faktors (angl. – *mating type*)
- NaCl** – Nātrija hlorīds
- NAD** – nikotīnamīdadenīna dinukleotīds
- NADP** – nikotīnamīdadenīna dinukeotīda fosfāts
- OD** – optiskais blīvums (angl. – *optical density*)
- ORI** – replikācijas sākumvieta (angl. – *origin of replication*)
- PMS** – fenazīna metasulfāts (angl. – *phenazine methosulfate*)
- PRA** –veidojas 5-fosforibozilamīns
- PRPP** – ribozes-5-fosfāts
- Q** – ubikvīnons (angl. – *ubiquinone*)
- qPCR** – kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (angl. – *quantitative polymerase chain reaction*)
- RNA** – ribonukleīnskābe (angl. – *ribonucleic acid*)
- rpm** – rotācijas minūtē (angl. – *rotations per minute*)
- rRNA** – ribosomālā ribonukleīnskābe (angl. – *ribosomal ribonucleic acid*)
- SAICAR** – 5-amino-1-(5-fosfo-D-ribozil)imidazol-4-karboksiamidosukcināts
- SD** – sintētiskā definētā barotne (angl. – *synthetic defined media*)
- SNV** – viena nukleotīda varianti (angl. – *single nucleotide variants*)
- TCA** – trikarboksilskābe (angl. – *tricarboxylic acid*)
- THF** – tetrahidrofolāts
- tRNA** – transporta ribonukleīnskābe (angl. – *transport ribonucleic acid*)
- ZMP** – 5-amino-1-(5-fosfo-D-ribozil)imidazol-4-karboksiamidoribonukleotīda monofosfāts
- μ** - specifiskais augšanas ātrums, h⁻¹

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Maizes rauga raksturojums

Raugi ir eikariotiski organismi, kas pieder sēņu valstij. Raugi ir polifilētisks taksons, kas ietver sevī sugas gan no asku sēņu (Johnson, 2013), gan bazīdiju sēņu tipa (Oberwinkler, 2012). Maizes raugs *Saccharomyces cerevisiae* ir asku sēņu tipam piederīgs raugs, kuru plaši izmanto pārtikā, rūpniecībā, kā arī pētniecībā. *S. cerevisiae* celma S288C genoms ir pirmais nosekvenētais eikariotu genoms (Goffeau et al., 1996). Nosekvenētais genoms, viegli iespējamā tā manipulēšana un ātrā augšana ļāvusi *S. cerevisiae* kļūt par eikariotiskās šūnas modeļorganismu, kas tiek plaši pētīts un izmantots (Sherman, 2002). Daudziem rauga gēniem eksistē homologu dzīvnieku genomā. Piemēram, Agmon un kolēģi (2020) *S. cerevisiae* septiņus raugu adenīna biosintēzes ceļa gēnus aizvietojuši ar cilvēka ortologiem. Izmantojot rauga šūnu kā eikariotiskas šūnas modeli, tas atļāvis atklāt evolūcijas gaitu un tās laikā notikušos molekulāros soļus, kā arī metaboliskās atšķirības un pielāgošanos šūnas iekšējai videi.

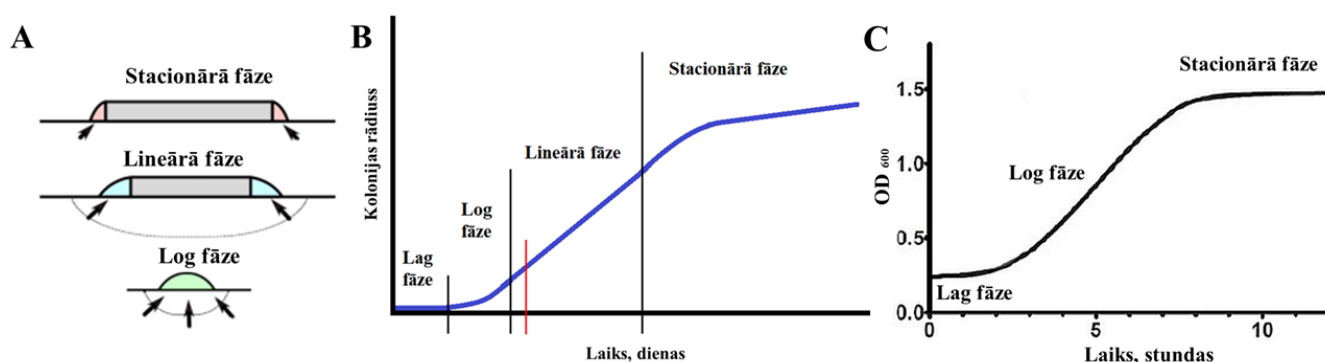
Pētījumos izmanto dažādus *S. cerevisiae* celmus. Celms CEN.PK 113-7D ir plaši izmantots sistēmbioloģijā (YeastGenome, 2022). CEN.PK celms no references celma S288C atšķiras ar vairāk nekā 20000 viena nukleotīda variantiem (SNV). Starp tiem pastāv arī vairākas metaboliskas atšķirības, piemēram, CEN.PK ir biotīna prototrofs un spēj gan uzņemt, gan pārstrādāt maltozi (Nijkamp et al., 2012). References celms S288C ir biotīna auktrotrofs un nespēj patērēt maltozi.

1.2. Raugu augšana

Mikroorganismu ir iespējams kultivēt šķidrās barotnēs vai uz agara platēm. Mikroorganismus šķidrā barotnē var kultivēt dažādos veidos un tilpumos. Ja pēc šūnu inokulācijas kultūrai audzēšanas laikā vairs netiek mainīts barotnes sastāvs, tad tādu kultivāciju sauc par periodisko (angl. – *batch*) (Hogg, 2005). Periodisko kultivēšanu var veikt kolbās, mēģenēs vai mikroplatēs. Izmantojot mikroplates, augšanas līknes var iegūt automātiski, mērot kultūras optisko blīvumu mikroplašu lasītājā. Šādi sasniegtais maksimālais augšanas ātrums ir salīdzināms ar to, kuru iegūst šūnu kultūru audzējot kolbā (Warringer et al., 2003a).

Agarizētās plates ir kultivēšanas vide, kas visvairāk līdzinās raugu dabiskajai videi, piemēram, augšanai uz augļu un dārzu virsmas, kur *S. cerevisiae* aug veidojot kolonijas (Meunier et al., 1999). Atkarībā no sākotnējā šūnu skaita, kas veido koloniju, izdala mikro- un makrokolonijas. Mikrokolonijas veidojas no vienas dalīties spējīgas šūnas, bet makrokolonijas – no vairākām, tuvumā esošajām, dalīties spējīgām šūnām (Váchova et al., 2013). Makrokolonijas var veidoties gan no vienas sugas vai celma šūnām, gan no dažādām sugām (Momeni et al., 2013). Makrokoloniju veidojošās šūnas ir ģenētiski un morfoloģiski homogēnākas, salīdzinot ar makrokoloniju veidojošām šūnām (Espagnon et al., 2014).

Mikroorganismiem augot gan šķidrā barotnē, gan agarizētajās barotnēs, novēro vairākas secīgas augšanas fāzes (1. attēls). Pēc mikroorganismu inokulācijas jaunā barotnē tie vispirms pielāgojas barotnei un pieejamā substrāta pārstrādei. Šo laiku sauc par lag fāzi (1. attēls). Tās ilgums ir atkarīgs no gan no barotnes veida, gan no inokulēto šūnu iepriekšējiem augšanas apstākļiem. Šīs fāzes laikā šūnu skaits praktiski nemainās, bet tām ir novērojama metaboliskā aktivitāte (Hogg, 2005).



1. attēls. A. Kolonijas dažādās augšanas fāzēs. Ar bultiņām norādītas šūnas, kas dalās, atrašanās vietas. Pelēkā līnija norāda barības vielu gradientu. Attēls izmainīts no Bär et al., 2020. B. Tipiska kolonijas augšanas līkne uz agarizētās barotnes. Sarkanā līnija norāda kolonijas detekcijas sliekšni. C. Tipiska rauga augšanas līkne šķidrā barotnē. Attēls izmainīts no Alsuhaime et al., 2013.

Figure 1. A. Colony in different growth phases. Arrows show location of dividing cells. The grey line indicates nutrient gradient. Figure adapted from Bär et al., 2020. B. Typical colony growth curve on agar plates. The red line indicates colony detection threshold. C. Typical yeast growth curve in liquid media. Figure adapted from Alsuhaime et al., 2013.

Pēc lag fāzes seko logaritmiskās (log) augšanas fāze. Log fāzes laikā notiek aktīva barības vielu patērēšana, un šūnu skaits šķidrās barotnes kultūrā pieaug eksponenciāli. Optimālos apstākļos log fāzes laikā šūnu kultūra vairākkārtīgi dubultosies, un šo laika posmu sauc par dubultošanās (angl. – *doubling*) laiku (Hogg, 2005). Log fāzes laikā tiek sasniegts maksimālais specifiskais augšanas ātrums (μ , h^{-1}), kas raksturo mikroorganismu biomasas pieaugumu laikā. To aprēķina kā šūnu kultūras optiskā blīvuma naturālogaritmu izmaiņu laikā. Kamēr barotnē ir pietiekoši daudz barības vielu, tas ir konstants. Tiklīdz kāds no substrātiem izsīkst, specifiskais augšanas ātrums samazinās, līdz iestājas stacionārā fāze. Tajā šūnu dalīšanās notiek lēnāk, un augšanas ātrums samazinās.

Koloniju augšana ir nedaudz atšķirīga. Rauga šūnas nav mobilas, tāpēc pēc dalīšanās tās paliek mātšūnas tuvumā. No sākuma šūna dalās horizontālajā plaknē, cita citu nedaudz pastumjot malā. Kad apmēram piecu šūnu rādiusā ap to vairs nav brīvas vietas, tad šūna dalās uz augšu un veido nākamo kolonijas šūnu slāni (Momeni et al., 2013). Laiku, kad kolonijas rādiuss pieaug visstraujāk, sauc par eksponenciālo jeb log fāzi (Váchová et al., 2012). Eksponenciālā augšanas fāze kolonijās ir salīdzinoši īsa un visbiežāk to nevar tieši detektēt (Bär et al., 2020; Rivas et al., 2014).

Kolonijai turpinot augt, tās augšanas ātrums samazinās, un seko lineārā augšanas fāze (1B. attēls), kurai raksturīgs lineārs kolonijas rādiusa pieaugums (Meunier et al., 1999). Ne visas kolonijā esošās šūnas aug tieši uz plates, lielākā daļa aug uz citām šūnām. Kolonijai augot, kolonijas centrā esošās šūnas pārstāj dalīties un ieies stacionārajā/ G_0 šūnu cikla fāzē. Aktīvi dalīties turpina kolonijas ārējā vai kolonijas virspusē esošās šūnas (1A. attēls) (Váchová et al., 2012).

Tad, kad kāda no barības vielām barotnē ir iztērēta, iestājas stacionārā fāze (Stahl et al., 2004). Atšķirībā no šķidrām barotnēm, agarizētajās barotnēs ap koloniju veidojas barības vielu gradients. Ar kratīšanas palīdzību šķidrā barotnē ir iespējams nodrošināt vienādu barības vielu pieejamību visām šūnām. Turpretim, augot uz agara barotnes, kolonijas tuvumā noteiktas barības vielas izsīkst ātrāk, un tādējādi koloniju augšanā iestājas stacionārā fāze (1A. attēls) (Meunier et al., 1999). Pēc stacionārās fāzes seko bojāejas fāze.

1.3. Pielāgotība

Pielāgotība ir organisma spējas izdzīvot un radīt pēcnācējus konkrētos apstākļos. Pielāgotība ir atkarīga no dažādām adaptācijām (angl. - *adaptation*). Tās var būt gan ģenētiskas, gan morfoloģiskas vai fizioloģiskas (Orr, 2005). Vienšūnu mikroorganismi ir piemēroti ģenētisko adaptāciju jeb mutāciju pētīšanai, lai noskaidrotu to efektu uz pielāgotību.

Attīstoties sekvencēšanās tehnoloģijām, pieaug arī nosekvencēto genomu, gēnu un alēļu daudzums. Piemēram, pēc *S. cerevisiae* genoma nosekvencēšanas 1996. gadā tikai apmēram 1/3 no 6000 gēniem bija eksperimentāli noteikta funkcija (Goffeau et al., 1996). Pēdējo gadu laikā anotēto gēnu skaits ir tikai pieaudzis, un 15 gadus vēlāk bija noskaidrota funkcija jau gandrīz 85% *S. cerevisiae* gēnu (Engel et al., 2013), tomēr joprojām ir gēni, kuru nozīme organismam eksperimentāli tā arī nav noteikta. Pie tam, bieži novēro, ka papildus gēna produkta galvenajai funkcijai tas ir iesaistīts arī citu, organismam nozīmīgu procesu veikšanā. (angl. – *moonlighting proteins*) (Espinosa-Cantú, et al., 2015). Nelielo ieguvumu hipotēze (angl. – *hypothesis of marginal benefits*) vēsta, ka daļa no gēniem nevienos apstākļos nebūs būtiski izdzīvošanai, bet tā vietā piedalīsies vairāku fizioloģisko funkciju regulācijā un precizēšanā (Thatcher et al., 1998).

Tāpat alternatīvi neitrālās molekulārās evolūcijas teorija (angl. – *neutral molecular evolution theory*) uzskata, ka augšanas apstākļiem nebūtiskie gēni laika gaitā uzkrās mutācijas, kas var novest pie šī gēna izmainītas sekvenses vai pat inaktivizācijas, tādējādi it kā “atbrīvojoties” no neizmantotā ģenētiskā materiāla (Kimura, 1991). Abām hipotēzēm pastāv arī eksperimentāli pierādījumi. Lai noskaidrotu katra gēna ietekmi uz organisma izdzīvotību, nosaka organisma pielāgotību (angl. – *fitness*).

Mutācijas piensums var būt atkarīgs no ģenētiskā fona (angl. – *genetic background*). Viena un tā pati mutācija dažādos organismos var izraisīt dažādus efektus. Vienā tā var sniegt pozitīvus ieguvumus, bet citā – negatīvus (Chandler et al., 2013).

Mutācijas nesošie organismi var kļūt par dominējošiem populācijā, ja to mutācijas sniedz nelielus ieguvumus (angl. – *marginal benefits*) pār citiem organismiem populācijā (Thatcher et al., 1998). Enerģijas taupīšanas hipotēze (angl. – *Hypothesis of energy saving*) vēsta, ka evolūcijas gaitā virsroku guvuši tie organismi, kas atraduši veidus kā ekonomēt enerģētiskos savienojumus, piemēram, ATP (Dykhuizen, 1978). Pastāv pieņēmums, ka substrāta līmeņa fosforilizācijas rašanās bija viens no galvenajiem posmiem agrīnajā eikariotu evolūcijā, kas ļāvusi gūt virsroku pār hemotrofiem (Dykhuizen, 1978).

1.3.1. Pielāgotības eksperimentālā noteikšana

Mikroorganismus pēc metabolisma īpatnībām iedala auktrotros un prototros. Auktrotros ir tādi organismi, kas nespēj sintezēt kādu no augšanai nepieciešamajām barības vielām, piemēram, vitamīnus, aminoskābes. Ja vidē nav pieejams attiecīgais metabolīts, tad auktrotrotu augšana un dalīšanās ir inhibēta. Savukārt prototroti ir spējīgi šo vielu sintezēt paši, un tie nav atkarīgi no tās pieejamības vidē (Zengler & Zaramela, 2018). Auktrotrots organisms pats nespēj sintezēt kādu aminoskābi, taukskābi, vitamīnu vai nukleotīdu (Pronk, 2002; Zengler & Zaramela, 2018). Auktrotrototrotu var izraisīt nebūtiska (angl. – *non-essential*) gēna izslēgšana vai arī vesela metaboliskā ceļa trūkums (Seif et al., 2020). Pētniecībā auktrotrototrotas nereti izmanto kā ģenētisko marķieri, kā arī antibiotiku alternatīvu atlases marķieri (Pronk, 2002).

Ģenētisko pielāgotību nosaka salīdzinot augšanas parametrus starp savvaļas tipa celmiem un *knock-out* mutantiem (Wiser et al., 2015). Gēnu delēcijas mutantu pielāgotības noteikšanas ļauj izdarīt secinājumus par sekām, kas radīsies šūnai, pazaudējot šo gēnu evolūcijas laikā (Warringer et al., 2003b). Delēcijas mutantu fenotipisko informāciju var izmantot arī, lai spriestu par proteoma un proteoma-genoma mijiedarbībām (Ideker et al., 2001).

Pielāgotību var noteikt ar ļoti dažādām metodēm - salīdzinot augšanas ātrumus, veicot kokultivācijas, sekvencējot transkriptomu. No mikroorganismu šķidrajām kultūrām ir iespējams iegūt datus par: lag fāzes ilgumu, specifisko augšanas ātrumu un maksimāli sasniegto kultūras optisko blīvumu jeb augšanas efektivitāti (angl. – *efficiency of growth*). Šos augšanas parametrus salīdzinot starp mutantiem un izejas celmu var noskaidrot gēna delēcijas ietekmi uz šūnas fizioloģiju un augšanu (Warringer et al., 2003b). Visbiežāk pielāgotības mērīšanai izmanto tieši augšanas ātrumu (Wiser et al., 2015).

Pielāgotību var noteikt arī salīdzinot kolonijas augšanas ātrumus uz agara platēm. Agarizētās barotnes ir mikroorganismiem raksturīga augšanas vide, kurā nozīmīgu lomu var spēlēt kādi no gēniem, kas nav nepieciešami šķidrajā barotnē. Pielāgotības rādītāji, kas iegūti mērot kolonijas, sniedz tāds pašus vai pat precīzākus mērījumus kā alternatīvas metodes (Baryshnikova et al., 2010). Koloniju izmēru noteikšanu laikā izmanto, lai noteiktu fenotipiskās atšķirības dažādos apstākļos starp vienas sugas dažādiem celmiem, kā arī lielās delēciju kolekcijās (Galardini et al., 2019). Ilgstoši audzējot kolonijas, ir iespējams noteikt arī nelielas pielāgotības atšķirības, kas neparādīsies salīdzinoši īsajās šķidrajās kultivācijās (Baryshnikova et al., 2010).

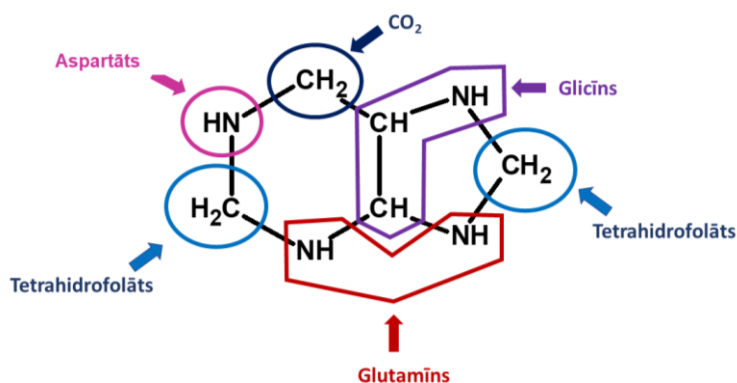
Pielāgotību var noteikt arī kokultivācijās – audzējot divus vai vairākus celmus vienlaicīgi vienā kolbā. Mikroorganismu attiecības var noskaidrot izmantojot bioķīmiskas atšķirības (Thatcher et al., 1998) vai arī izdalot genomisko DNA un veicot qPCR analīzi (Baek et al., 2020). Videi pielāgotākais organisms būs pārākumā.

Sekvencēšanas metožu attīstība paplašināja arī pielāgotības noteikšanas metožu klāstu, kas vienlaicīgi ļāva noteikt arī atbilstošos ģenētiskos procesus. Pielāgotību var noteikt arī pēc gēnu kopiju skaita izmantojot, piemēram, DNA iezīmju sekvencēšanu (angl. – *DNA barcode sequencing*) (Han et al., 2010). Analizējot šūnas transkriptomu, ir iespējams noteikt, kuri gēni konkrētajā brīdī ir ekspresēti (DeRisi et al., 1997), tādējādi ļaujot noskaidrot, kuri gēni jāekspresē konkrētajos apstākļos.

1.4. Maizes rauga fizioloģija

1.4.1. Purīnu biosintēzes ceļš

Purīni ir aromātiski, heterocikliski savienojumi, ko veido slāpekļa un oglekļa atomi. Purīni ir adenīns un guanīns, kuri abi ir sastopami DNA un RNA sastāvā (Kumari, 2018). Purīni veido arī citas molekulas – enerģētiski bagātajā adenīna trifosfātā (ATP), kofaktorus NADH un FADH₂, kā arī koenzīmā A. Purīnu atomi nāk no dažādām molekulām: aspartāta, oglekļa dioksīda, tetrahidrofolāta (THF), glicīna un glutamīna (2. attēls).



2. attēls. Purīnu atomu izcelsme. Attēls izmainīts no Reichardt et al., 2011.

Figure 2. The origin of atoms in a purine molecule. Figure changed from Reichardt et al., 2011.

Purīnu biosintēzes ceļš ir evolucionāri konservatīvs jeb līdzīgs dažādiem organismiem (Agmon et al., 2020). *S. cerevisiae* un cilvēka purīnu *de novo* sintēzes ceļš atšķiras ar nepieciešamo gēnu skaitu – *S. cerevisiae* adenīna biosintēzes ceļu kodē 10 gēni, bet cilvēkam – septiņi (Agmon et al., 2020). Purīnu *de novo* sintēzes ceļš ir lineārs, un katra tā solī purīnu molekulai pievieno tikai vienu vai divus atomus (3. attēls).

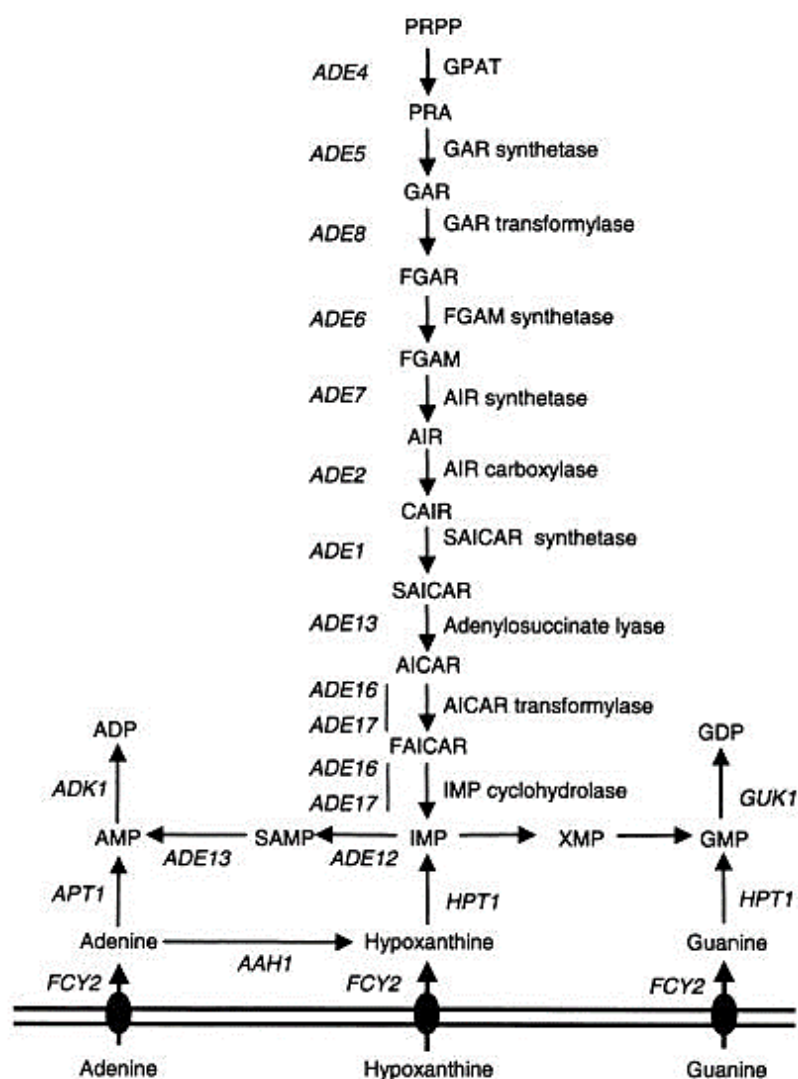
Pirmajā solī ribozes-5-fosfātam (PRPP) pievieno glutamīna amino grupu, un veidojas 5-fosforibozilamīns (PRA) (Nelson et al., 2001). Šo reakciju katalizē Ade4 (E.C. 2.4.2.14), un tā ir atgriezeniska (YeastPathways, 2022). 5-fosforibozilamīns ir nestabils savienojums (Nieto et al., 1983). Tālāk, izmantojot vienu ATP molekulu, PRA molekulai tiek pievienots glicīns un veidojas fosforibozilglicīnamīns (GAR); reakciju katalizē fosforibozilglicīnamidīna sintetāze Ade5 no Ade5,7 (E.C. 6.3.4.13) (Jones et al., 1982; YeastPathways, 2022). Reakcijas trešajā solī, kuru katalizē glicīnamīda ribotīda transformilāze Ade8 (E.C. 2.1.2.2), no GAR, pievienojot vienu aldehīda grupu, veidojas formilfosforibozilglicīnamīns (FGAR), tiek oksidēta viena 10-formiltetrahidrofolāta molekula, un kā blakusprodukts veidojas tetrahidrofolāts (THF) (Jones et al., 1982 & YeastPathways, 2022). Arī šī reakcija ir atgriezeniska (YeastPathways, 2022).

Purīnu biosintēzes ceturtajā solī pie FGAR, patērējot vienu ūdens un ATP molekulu, no glutamīna pievieno aminogrupu. Aminācijas reakciju veic fosforibozilformilglicīnamidīna sintetāze Ade6 (E.C. 6.3.5.3) (Andreichuk et al., 1997). Tad no formamido-fosforibosilacetamīda (FGAM), izmantojot vienu ATP molekulu, tiek noslēgts viens no purīnu gredzeniem. Soli katalizē FGAM sintetāze Ade7 (E.C. 6.3.3.1) no proteīnu kompleksa Ade5,7 (Jones et al., 1982).

Sestajā solī purīnu biosintēzes ceļā no aminoimidazola ribonukleotīda (AIR), uzņemot vienu CO₂ molekulu, tiek uzsynetēts CAIR (karboksilamino inidazola ribonukleotīds). Šo reakciju katalizē AIR karboksilāze Ade2 (E.C. 4.1.1.21.), un tā ir atgriezeniska (Dorfman, 1969; YeastPathways, 2022).

Septītajā solī Ade1 (E.C. 6.3.2.6.) CAIR molekulai pievieno aspartāta amino grupu, un izveidojas SAICAR, bet nākamajā reakcijā Ade13 (E.C. 4.3.2.2.) tiek nošķelta sukcināta grupa, kas izdalās kā blakusprodukts – fumarāts (Dorfman, 1969). Reakcija ir atgriezeniska (YeastPathways, 2022). *ADE13* ir būtisks gēns, jo tā mutanti normālos apstākļos nav dzīvotspējīgi (Giaever et al., 2002), tomēr *ADE13 knock-out* mutanti ir dzīvotspējīgi, ja ir izņemts arī kāds gēns purīnu biosintēzes augšdaļā (Agmon et al., 2020).

Nākamās divas reakcijas katalizē paralogi Ade16Ade17 (E.C. 2.1.2.3. & E.C. 3.5.4.10.). Pirmajā, patērējot formil-THF un kā blakusproduktu izvadot THF, rodas formilaminoimidazola karboksamīdribonukleotīds (FAICAR), bet otrajā – no FAICAR atšķel vienu ūdens molekulu (YeastPathways, 2022). Reakcijas gaitā rodas inozīna monofosfāts (IMP). IMP ir sazarojumu punkts purīnu biosintēzes ceļā. No tā var tikt synetēts gan adenīns, gan guanīns – nukleīnskābēs esošie purīni.



3. attēls. Purīnu biosintēzes un uzņemšanas ceļš *S. cerevisiae*. Attēls no Reбора et al., 2001.

Figure 3. Purine salvage and biosynthesis pathway in *S. cerevisiae*. Figure from Reбора et al., 2001.

1.4.2. Purīnu biosintēzes ceļa regulācija

Purīnu sintēze ir enerģētiski dārgs un prasa daudz un dažādas izejvielas, tāpēc tā tiek regulēta. Purīnu *de novo* sintēzi regulē tā starpprodukti un galaprodukti caur negatīvo atgriezenisko saiti (Réбора et al., 2001).

Ade4 ir purīnu biosintēzes ceļa pirmais enzīms, un ir iesaistīts vairākos šī ceļa regulatorajos procesos. Ade4, tāpat kā nākamo sešu soļu mutantiem ir novērojama zemāka visu *ADE* gēnu ekspresija (Réбора et al., 2001). Ja Ade4 ir pārlietu ekspresēts (angl. – *overexpressed*) – tas noved pie pārējo *ADE* gēnu samazinātas ekspresijas (Réбора et al., 2001) un veicina SAICAR un AICAR uzkrāšanos šūnā (Réбора et al., 2001; Réбора et al., 2005).

SAICAR ir nepieciešams, lai netieši nodrošinātu Bas1 un Pho2 mijiedarbību (Rébora et al., 2001). Bas1 un Pho2 veido kompleksu, kas aktivizē visu *ADE* gēnu ekspresiju (Daignan-Fornier et al., 1992). Papildus Bas1 un Pho2 kompleksam, gēna *ADE57* ekspresijai ir nepieciešami arī SAGA un SWI/SNF kompleksi (Koehler et al., 2007). Arī purīnu biosintēzes ceļa nākamais savienojums AICAR ir spējīgs aktivizēt *ADE* gēnu transkripciju (Rébora et al., 2005).

AICAR ir šūnām toksisks savienojums, kuram uzkrājoties, tas tiek metabolizēts par AICAR monofosfātu (ZMP). ZMP izjauc nukleāro proteīnu transportu un palielina nukleosomu veidojošo proteīnu ekspresiju (Douillet et al., 2019). AICAR ir starpprodukts gan purīnu, gan histidīna biosintēzes ceļā, tā uzkrāšanās šūnās izraisa gan adenīna, gan histidīna auksotrofiju (Rébora et al., 2005). AICAR saistās ar Bas1-Pho2 kompleksu, kā arī Pho2 un Pho4 transkripcijas faktoriem, tādējādi tas piedalās gan purīnu, gan fosfāta, gan histidīna metabolismu regulācijā (Pinson et al 2009).

Purīnu biosintēzes pirmo soli, kuru katalizē Ade4 enzīms, var inhibēt ar purīnu biosintēzes galaproduktu adenoziņa difosfātu (ADP). ADP klātbūtnē *ADE4* gēna ekspresija ir samazināta (Nieto & Woods, 1983). *ADE4* ekspresiju var inhibēt arī ārpusšūnām esošais vai neesošais purīns. No sākuma ekstracelulārais adenīns ir jāuzņem šūnās un jāfosforalizē līdz ADP, lai tas varētu inhibēt Ade4 (Rébora et al., 2001). Ja ārpusšūnām nav purīnu – adenīna, hipoksantīna – tiek aktivēti transkripcijas faktori Bas1 un Pho2, kas savukārt aktivē visus *ADE* gēnus (Rébora et al., 2001).

1.4.3. Mitohondriju metabolisms

Mitohondriji ir ar membrānu ietverti organoīdi eikariotiskās šūnās. Tie ir cēlušies no aeroba prokariota – α -proteobaktērijas (Gray et al., 1999), kuri endosimbiozes ceļā iekļāvušies eikariotu šūnās (Martin et al., 2015). Evolūcijas gaitā daļa no endosimbiotiskā prokariota genoma ir pazudis vai arī iekļauts “saimniekšūnas” kodolā (Malina et al., 2018), bet mitohondrija genoms nav pilnībā izzudis. *S. cerevisiae* mitohondrija genoms ir 85 kb garš, kas kodē astoņus proteīnus – septiņi no tiem veido elektronu transporta ķēdes subvienības, bet viens ir daļa no ribosomas mazās subvienības (Foury et al., 1998). Nukleīnskābei ir trīs aktīvi replikācijas sākumpunkti (ORI) un pieci ORI-līdzīgi elementi, kā arī 24 tRNA un divi rRNA gēni 15S un 21S (Foury et al., 1998). Izņemot mazās ribosomas subvienības Var1 un ATP sintēzes Atp9 subvienību, kā arī izmaiņas I kompleksā, pārējie gēni *S. cerevisiae* mitohondrija genomā ir konservatīvi arī cilvēkam (Malina et al., 2018).

Mitochondriji ir šūnas organoīdi, kas ģenerē metabolisko enerģiju enerģētiskā savienojuma adenozintrifosfāta (ATP) veidā. Mitochondrija matriksā Krebsa cikls saražo elektronu pārnēsējmolekulas (NADH un FADH₂), kuras vēlāk nodrošina elektronu transporta ķēdes darbību un protonu gradienta veidošanos. Pēc gradienta izveides, protoni plūst atpakaļ mitochondrija matriksā caur ATP sintāzi, kas sintezē ATP molekulas (Cooper et al., 2000).

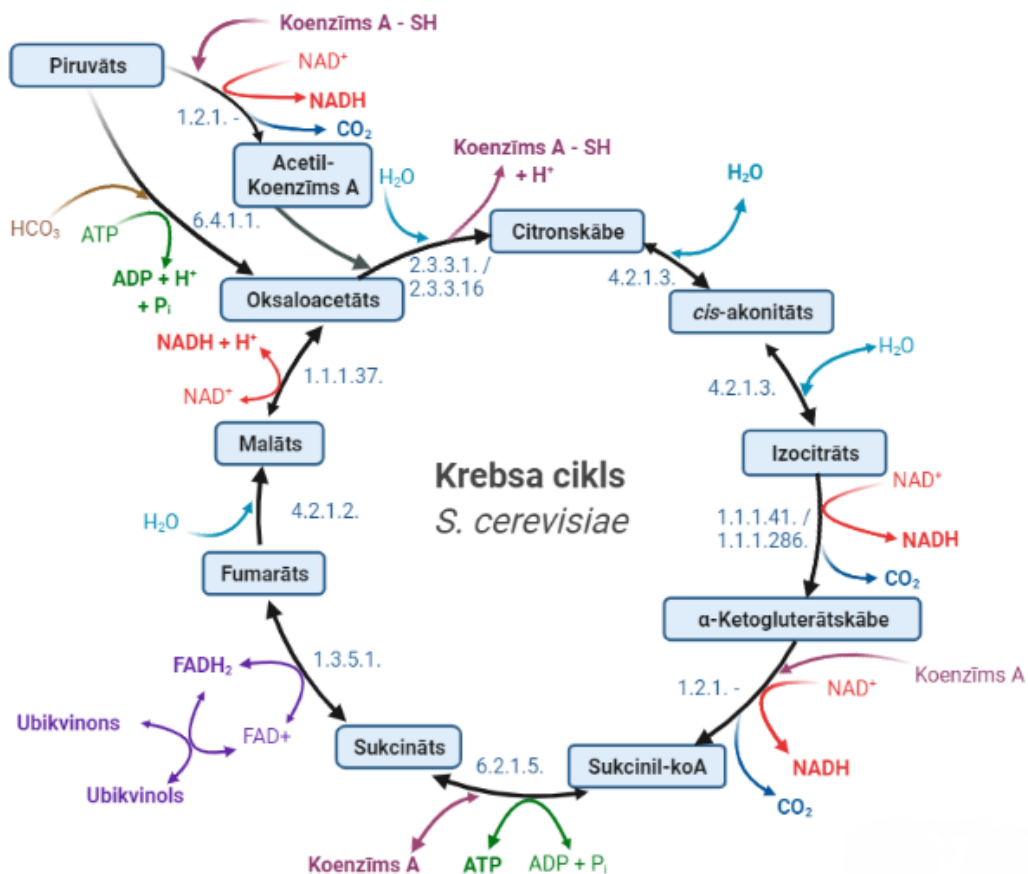
Daļējs vai pilnīgs mitohondrionālā DNA zudums vai izmaiņas kodolā kodētajos mitohondrionālajos proteīnos noved pie *petite* fenotipa rašanās (Day, 2013). *Petite* celmi, aerobi augot, veido mazākas kolonijas nekā savvaļas celms. *Petite* mutantus atšķir pēc to nespējas augt uz nefermentējamiem oglekļa avotiem (Day, 2013). Cilvēkam traucējumi mitochondrija metabolismā raksturīgi vairākām slimībām, piemēram, Lēbera iedzimtajai optiskajai neiroopātijai (LHON), Pārkinsona un Hantingtona slimībām (Schapira, 2006).

1.4.4. Krebsa cikls

Glikoze tiek ietransportēta šūnās, un glikolīzes ceļā sašķelta līdz piruvātam. Piruvāta dehidrogenāzes komplekss (E.C. 1..2.1. -) pārveido piruvātu un koenzīmu A-SH par Acetilkoenzīmu A. Reakcijas laikā tiek reducēts NAD⁺ par NADH, kā arī izdalās CO₂ (Nelson et al., 2001). Krebsa cikls, arī trikarbonskābju cikls (TCA cikls), (4. attēls) sastāv no astoņām reakcijām. Oglekļa atomi Krebsa ciklā tiek uzņemti ar acetilkoenzīmu A, kas kopā ar oksaloacetātu piedalās citrāta sintāzes (E.C. 2.3.3.1./2.3.3.16.) reakcijā, patērējot vienu ūdens molekulu. Šīs reakcijas produkts ir citronskābe, bet blakusprodukts – koenzīms A.

Krebsa cikla otrais solis formē izocitrātu ar *cis*-akonitātu kā starpproduktu. *Cis*-akonitāts parasti nepamet akotināta hidralāzes (E.C. 4.2.1.3.) aktīvo centru. Reakcijas pirmajā daļā tiek atbrīvota viena ūdens molekulu, bet reakcijas otrajā daļā – viena ūdens molekula tiek saistīta. Visa akotināta hidralāzes katalizētā reakcija ir atgriezeniska (Nelson et al., 2001; YeastPathways, 2022).

Trešais solis Krebsa ciklā ir izocitrāta oksidācija par α -ketoglutarātu (4. attēls). Šo reakciju katalizē NAD-atkarīgā izocitrāta dehidrogenāze (E.C. 1.1.1.41./1.1.1.286.), to kodē gēni *IDH1/2* (YeastGenome, 2022). *S. cerevisiae* ir trīs dažādi izozīmi izocitrāta dehidrogenāzei. Šie enzīmi piedalās arī glutamāta metabolismā (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993). Divas no tām ir lokalizētas mitohondrija matriksā, bet viena – citosolā (YeastGenome, 2022). Mitohondrija matriksā ir NAD-atkarīgā un NADP-atkarīgā izocitrāta dehidrogenāze (gēns *IDP1*), bet citosolā otra – NADP-atkarīgā izocitrāta dehidrogenāze (kodē gēns *IDP2*) (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993). Mitohondrijā esošais *Idp1* enzīms nepiedalās Krebsa ciklā, lai gan atrodas matriksā; *Idh1/2* ir Krebsa cikla enzīms (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993). *Idh1/2* izslēgšanas gadījumā *Idp2* citosolā nodrošina α -ketoglutarātu gan glutamīna sintēzei, gan Krebsa ciklam (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993). α -ketoglutarāts, antiportējot malātu, var tikt transportēts gan uz, gan no mitohondrija caur *Odc1/2* transporteri (Palmieri et al., 2006).



4. attēls. Maizes rauga *S. cerevisiae* Krebsa cikls. Autora attēls. Izveidots biorender.com

Figure 4. Baker's yeast *S. cerevisiae* TCA cycle. Author's figure. Figure generated in biorender.com

Krebsa cikla (4. attēls) ceturtais solis ir α -ketoglutarāta oksidēšana par sukcinil-koenzīmu A un oglekļa dioksīdu, patērējot acetilkoenzīmu A. Šajā solī NAD^+ kalpo par elektronu akceptoru un veidojas NADH (Hirayashi et al., 1971). Reakciju katalizē α -ketoglutarāta dehidrogenāzes komplekss (E.C. 1.2.1. -). Krebsa cikla piektais solis ir sukcinil-koenzīma A pārveide par sukcinātu. Reakciju katalizē sukcinil-koenzīma A ligāze (E.C. 6.2.1.5.), un tā no ADP un fosfāta grupas izveido vienu ATP molekulu. Reakcijā kā blakusprodukts rodas koenzīms A (YeastPathways, 2022).

Nākamā Krebsa cikla reakcija ir sukcināta oksidācija par fumarātu (4. attēls). To katalizē sukcināta dehidrogenāze (Kregiel, 2012). Sukcināta dehidrogenāze ir arī mitohondrionālās elektronu transporta ķēdes II komplekss (Oyedotun et al., 2004; Kregiel, 2012). Sukcināta oksidācijas laikā tiek reducēts FAD^+ par FADH_2 un divi elektroni tiek novadīti elektronu transporta ķēdē (Kregiel, 2012). Krebsa cikla septītais solis ir fumarāta hidrācija par L-malātu (Nelson et al., 2001). Reakciju katalizē fumarāta hidralāze (E.C. 4.2.1.2.), un tā patērē vienu ūdens molekulu (YeastPathways, 2022). Krebsa cikla pēdējais posms ir malāta oksidācija par oksaloacetātu. Šo reakciju katalizē mitohondrionālā malāta dehidrogenāze Mdh2 (E.C. 1.1.1.37.), un tā ir atgriezeniska (YeastPathways, 2022). Reakcija vienlaicīgi reducē vienu NAD^+ molekulu. *S. cerevisiae* ir vēl divas malāta dehidrogenāzes, kuras atrodas citosolā (Mdh2) (Minard & McAlister-Henn, 1991) un glioksisomās (Mdh3) (Moriyama et al., 2018).

No viena Krebsa cikla apgrieziena *S. cerevisiae* rada trīs NADH molekulas, kā arī vienu FADH_2 un vienu ATP molekulu. No vienas glikozes molekulas ir iespējams veikt divus Krebsa ciklus.

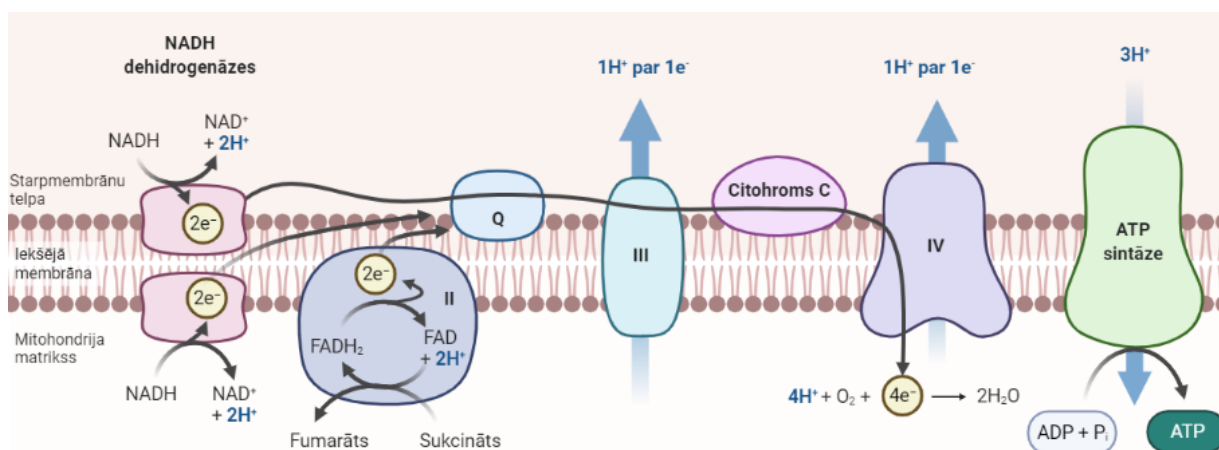
1.4.5. Mitohondriju elektronu transporta ķēde

S. cerevisiae mitohondrija elektronu transporta ķēdē par elektronu donoru kalpo NADH un FADH_2 , bet par akceptoru – skābeklis O_2 (Tielens et al., 2002). Elektronu transporta ķēde (5. attēlā) ir pēdējais posms aerobajā elpošanā. Lielākajai daļai eikariotu tā sastāv no četriem kompleksiem un ATP sintāzes (Joseph-Horne et al., 2001). Atšķirībā no cilvēka un lielākās daļas citu eikariotu mitohondrionālo elektronu transporta ķēdi, *S. cerevisiae* komplekss I ir aizstāts ar divām NADH dehidrogenāzēm, tādējādi arī zaudējot protonu pārnese spēju šajā kompleksā (Malina et al., 2018). Sākumā *S. cerevisiae* elektronu transporta ķēde ir zarota (Joseph-Horne et al., 2001). NADH dehidrogenāzes (E.C. 1.6.5.3.) atrodas abās pusēs mitohondrija iekšējai membrānai (Kroneková, 2005). Tās oksidē no Krebsa cikla iegūtās NADH molekulas par NAD^+ , protonu (H^+), un reakcijas divi elektroni tiek transportēti uz ubikvinonu (Q) (Joseph-Horne et al., 2001).

Ubikvinons ir mobila molekula, kas pārvietojas starp NADH dehidrogenāzēm, II kompleksu un III kompleksu (Wang et al., 2016; YeastPathways, 2022). Saņemot divus elektronus, ubikvinons tiek oksidēts par ubikvīnolu (Wang et al., 2016).

Metformīns ir viela ar pleiotropiskiem efektiem. Lielākajai daļai no eikariotiem metformīns inhibē I kompleksu (El-Mir et al., 2000). *S. cerevisiae* I kompleksa vietā satur divas NADH dehidrogenāzes (Malina et al., 2018), kuras nav sensitīvas pret metformīnu (Wheaton et al., 2014). Metformīna klātbūtnē ATP sintāzes ekspresija un sintezētais ATP daudzums ir samazināts, savukārt kompleksu III un IV transkripcija ir palielināta (Borklu-Yucel et al., 2015). Metformīns koordinē mitohondrija metabolismu caur savienojumiem citoplazmā, jo metformīna ietekme dzīvās šūnās un atsevišķi izdalītos mitohondrijos atšķiras (Fontaine 2018). Metformīns supresē arī dzelzs hēmu sintēzi (Li et al., 2019).

S. cerevisiae sukcināta dehidrogenāzes komplekss (komplekss II; E.C. 1.3.5.1) nepiedalās protonu pārnēsē. *S. cerevisiae* kompleksam ir piecas prostētiskās grupas: flavīna adenīna dinukleotīds (FAD), trīs dzelzs-sēra klasteri un b-tipa hēma grupa. Galvenās katalītiskās grupas Sdh1 un Sdh2 (Joseph-Horne et al., 2001). Sukcināta dehidrogenāze ir arī Krebsa cikla enzīms. Komplekss II oksidē sukcinātu par fumarātu un vienlaicīgi FAD⁺ tiek reducēts par FADH₂ (Oyedotun et al., 2004). Tā kā flavīna adenīna dinukleotīds ir piesaistīts II kompleksam, FADH₂ tiek oksidēts atpakaļ par FAD⁺ un divi elektroni reducē ubikvīnonu (Oyedotun et al., 2004).



5.attēls. Maizes rauga *S. cerevisiae* mitohondrionālā elektronu transporta ķēde. Autora attēls. Attēls izveidots biorender.com.

Figure 5. Baker's yeast *S. cerevisiae* mitochondrial electron transport chain. Author's figure. Figure created in biorender.com.

Pēc oksidācijas ubikvīnols pārvietojas līdz III jeb bc1 kompleksam (E.C. 1.10.2.2.) un tiek reducēts atpakaļ par ubikvīnonu (Hunte et al., 2003; YeastPathways, 2022). Citohroma b subvienība satur divus katalītiskos centrus, bet c1 vienība – vienu (Zara et al., 2009). Bc1 komplekss darbojas caur Q-cikla mehānismu (Crofts, 2004). Elektroni tiek pārnesti uz citohromu C (E.C. 7.1.1.8.), kas tiek reducēts; vienlaicīgi par katru pārnesto elektronu viens protons tiek pārvietots no mitohondrija matricas uz starpmembrānu telpu (Hunte et al., 2003).

Antimicīns A ir bc1 kompleksa inhibitors (Hunte et al., 2003; Boumans et al., 1998). Tas specifiski inhibē ubikvīnola redukcijas centru un 1:1 saista III kompleksu, tādējādi inhibitora relatīvā piesātinājums ir tieši proporcionāls kompleksa aktivitātei (Boumans et al., 1998). Jo mazāka III kompleksa aktivitāte, jo lēnāk notiek elektronu transports ķēdē, līdz ar to arī ATP sintēze. Ir sagaidāms, ka antimicīna A klātbūtnē *S. cerevisiae* nespēs augt uz nefermentējamiem oglekļa avotiem, piemēram, glicerīna (Walden et al., 2020).

Citohroma C reducētā forma pārvietojas uz IV kompleksu (Citohroma C oksidāze; E.C. 1.9.3.1). Tur citohroms C tiek oksidēts un vienlaicīgi reducē O₂ par ūdeni H₂O, kā arī notiek protona pārnese pāri mitohondrija iekšējo membrānu (Geier et al., 1995). Komplekss IV sastāv no 11 subvienībām, no kurām trīs tiek kodētas mitohondriālajā genomā (Cooper et al., 1991). To inhibē cianīdi (CN) (Geier et al., 1995). *Crabtree* negatīvie raugi ir cianīdu rezistenti, bet *crabtree* pozitīvie raugi ir cianīdu sensitīvi (Veiga et al., 2003).

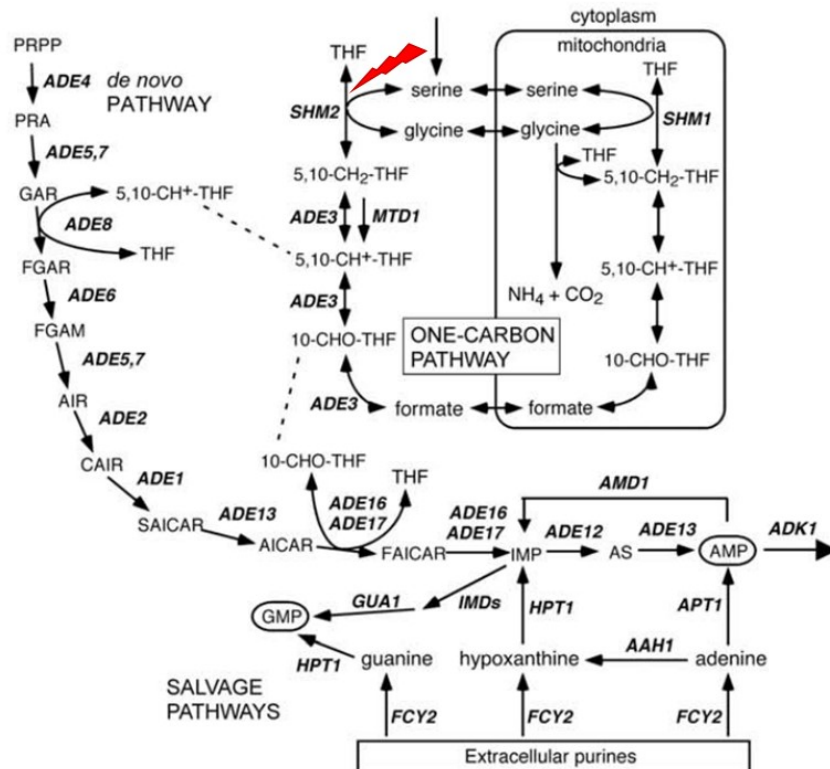
Nātrija valproāts ir Citohroma C oksidāzes inhibitors, bet neizmaina III un IV kompleksa aktivitāti (Salsaa et al., 2020). Nātrija valproāta augšanas inhibīcija ir atkarīga no devas, tas arī izraisa apoptozi no G₁ cikla fāzes (Ma et al., 2017). Valproāta klātbūtne palielina glikolīzes starpproduktu ražošanu, kā arī palielina glikolītisko gēnu ekspresiju un etanola ražošanu. Nātrija valproāts arī samazina *S. cerevisiae* skābekļa patēriņu (Salsaa et al., 2020).

Elektronu pārnēsējmolekulas NADH un FADH₂, oksidējoties elektronu transporta ķēdē, ļauj pārnest protonus uz mitohondrija starpmembrānu telpu, veidojot elektroķīmisko gradientu (Campbell et al., 2018). Izveidotais elektroķīmiskais gradients caur ATP sintāzi (E.C. 7.1.2.2.) nokļūst atpakaļ matricā. Lai sintezētu vienu ATP molekulu, rotoram ir nepieciešams veikt 120° apgriezīgu, patērējot trīs līdz četrus protonus (Stock, 1999). No vienas glikozes molekulas, Krebsa cikls veic divus apgriezienus, katrā apgriezienā sintezējot 1 FADH₂ un trīs NADH, kā arī vienu ATP molekulu. Oksidatīvās fosforilācijas laikā no elektronu pārnēsējmolekulām elektroni tiek nogādāti elektronu transporta ķēdē, ģenerējot protonu gradientu. Šis protonu gradients pēc tam ģenerē apmēram 18 ATP molekulas (Pfeiffer et al., 2014).

1.4.6. Folātu cikls

Eikariotos folātu metabolisms ir norisinās citoplazmā un mitohondrijā. Folskābe ir viens no organismiem nozīmīgākajiem vitamīniem. Tā aktīvā forma ir tetrahidrofolāts (THF). Tas spēj pārvietot vairākus viena oglekļa atoma vienības dažādās oksidācijas pakāpēs, kurus patērē vairāki metaboliskie ceļi (Christensen et al., 2006). Purīnu *de novo* sintēzes ceļam ir divi soļi, kuros jāpatērē viena oglekļa atoma folāti: GAR transformilāze (E.C. 2.1.2.2.) un AICAR transformilāze (E.C. 2.1.2.3.). (6. attēls). Reducēti folāti ir sastopami gan citoplazmā, gan mitohondrijā. Reducētā veidā tie nespēj šķērsot mitohondrionālās membrānas, tāpēc vien-oglekļa vienības tiek pārvietotas ar vien-oglekļa donoriem: serīnu, glicīnu un formātu (Matecic et al., 2010).

Folātu cikls mitohondrijā ir oksidatīvs, bet citoplazmā – reducējošs. Lielākā daļa no vien-oglekļa vienībām *S. cerevisiae* mitohondrijos nonāk caur glicīnu un serīnu, tādējādi ražojot formātu, kas vēlāk tiek nogādāts atpakaļ citoplazmā (Christensen et al., 2006). Vien-oglekļa vienību uzņemšanu ar formātu var inducēt izmantojot metatreksātu – dihidrofolāta reduktāzes inhibitoru (Pasternack et al., 1996) (6. attēls). Šādā gadījumā folāta cikls griežas pretējā virzienā (Pasternack et al., 1996).



6. attēls. Purīnu *de novo* sintēzes ceļa saistība ar folātu ciklu. Sarkanā bultiņa apzīmē metatreksāta inhibīcijas vietu. Attēls no Matecic et al., 2010.

Figure 6. Purine *de novo* synthesis pathway's connection to folate cycle. Red arrow denotes methotrexate inhibition place. Figure from Matecic et al., 2010.

Lielākā daļa no citoplazmā saražotā formil-THF tiek izmantota purīnu *de novo* sintēzei (Pasternack et al., 1996). Vismaz 25% no vien-oglekļa vienībām, kas tiek izmantotas purīnu sintēzei, nāk no formāta kā donora (Christensen et al., 2006).

Purīnu *de novo* ceļa otrajā solī tiek patērēta viena glicīna molekula (Jones et al., 1982; YeastPathways, 2022). Glicīns var tikt sintezēts gan citoplazmā, gan mitohondrijā folāta cikla laikā (Matecic et al., 2010) (6. attēls). Tas var tikt pārvietots no citoplazmas uz mitohondriju caur transporteri Hem25 (Ferramosca & Zara, 2021).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Raugu celmi

Darba izstrādāšanā izmantotie celmi ir redzami 1. tabulā. Mikroorganismu kolekciju uzglabā -80° C 15% glicerīnā un 0,9% NaCl maisījumā. Lai sagatavotu šūnas eksperimentiem, no saldēšanas mikromēģenes ar mikrobioloģisko cilpu veic izkļiedējošo uzsējumu uz pilnās rauga barotnes (YPD) plates. Plates +30° C inkubatorā 24 h vai arī līdz skaidri izšķiramas atsevišķas kolonijas. Plates ar izaugušām rauga kultūrām glabā ledusskapī +4° C. Reizi četros mēnešos veic tīrkultūras pārsēšanu uz jaunu YPD plati. Pārsēšanu atkārto līdz 5 reizēm, bet pēc tam veic jaunu izkļiedējošo uzsējumu no -80° C noglabātās mikroorganismu kultūras.

1. tabula

Darbā izmantotie raugu celmi.

Table 1

Used yeast strains.

Celms	Celma genotips	LU MBI kolekcijas nr.	Celmu izcelsme
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK prot*	CEN.PK 113-7D MATa	Y78	Dāvana no Peter Richard, VTT Biotechnology, Somija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade1	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade1::KanMX</i>	Y208	Sporu disekcija, LU MBI kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade2	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade2::KanMX</i>	Y211	Sporu disekcija, LU MBI kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade4	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade4::KanMX</i>	Y249	Sporu disekcija, LU MBI kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade57	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade57::KanMX</i>	Y256	Transformācija, LU MBI kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade6	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade6::KanMX</i>	Y228	Sporu disekcija, LU MBI kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade8	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade8::KanMX</i>	Y218	Transformācija, LU MBI kolekcija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK ade16ade17	CEN.PK 113-7D MATa <i>ade16::KanMX</i> <i>ade17::KanMX</i>	Y257	Transformācija, LU MBI kolekcija

*Treknrakstā norādīti turpmāk darbā izmantotie celmu apzīmējumi

2.2. Reāģenti

Darbā izmantotie reāģenti redzami 2. tabulā.

2. tabula

Darbā izmantotās vielas un to izcelsme.

Table 2

Used compounds and their origin.

Viela	Tīrības pakāpe	Ražotājs	Izcelsmes valsts
Adenīna hemisulfāts	≥ 99%	Sigma Aldrich	Vācija
Agars	MA	Biolife Group	Itālija
Etanols	96%	Jaunpagasts	Latvija
Glicerīns		Enola	Latvija
Galaktoze	≥ 99%	Sigma Aldrich	Vācija
Glikozes monohidrāts	≥ 99%	Sigma Aldrich	Vācija
Nātrija hlorīds	≥ 99%	Sigma Aldrich	Vācija
Peptons	MA	Biolife Group	Itālija
Rauga ekstrakts	MA	Biolife Group	Itālija
Tetraciklīns	≥ 98%	Sigma Aldrich	Vācija
Izocitrskābe	≥ 99%	Sigma Aldrich	Vācija
Hidroksidzintarskābe		Sigma Aldrich	Vācija
α - ketoglutarāts	≥ 9%	Sigma Aldrich	Vācija
Saponīns	LV	Sigma Aldrich	Vācija
Fenazīna metasulfāts (PMS)	≥ 90%	Sigma Aldrich	Vācija
β-NAD hidrāts	≥ 96,5%	Sigma Aldrich	Vācija
Jodonitrotetrazolija hlorīds (INT)	≥ 97%	Sigma Aldrich	Vācija
Proteāžu inhibitors complete Mini		Roche	Vācija
Metformīns		Roche	Vācija
Metatreksāts	≥ 99%	Sigma Aldrich	Vācija
Antimicīns A	≥ 97%	Sigma Aldrich	Izraēla
Sālsskābe		Sigma Aldrich	Vācija
Nātrija valproāts	≥ 98%	Sigma Aldrich	Vācija
Dimetilsulfāts (DMSO)	99,9%	Sigma Aldrich	Francija
Trizma base	99,9%	Sigma Aldrich	ASV

LV – piemērots laboratorijas vajadzībām

MA – piemērots mikrobioloģiskām analizēm

Darba izstrādē izmantoja pilno sintētisko barotni (SD; angl. – *Synthetic Defined*). Vienu litru barotnes pagatavo pēc Miller et al., 2017 receptes (1. pielikums); 6,7 g sāļu maisījumam pievieno 1 mL 1000x metālu un 1 mL 1000x vitamīnu maisījuma, un to atšķaida 900 mL destilēta ūdens. Atsevišķi pagatavo 100 mL oglekļu avotu šķīdumu. 20% glikozes šķīdumu gatavo no 22 g glikozes monohidrāta un 85 mL destilēta ūdens, bet 20% galaktozes šķīdumu – no 20 g galaktozes un 100 mL destilēta ūdens. Pagatavotos šķīdumus autoklavē. Šeit un turpmāk autoklavēšana notiek 121 °C 15 min. Glikozes šķīdumu pēc autoklavēšanas pievieno SD barotnei. Sintētisko barotni bez slāpekļa (N-) pagatavo pēc Miller un kolēģu (2017) receptes, bet sāļu maisījumam nepievieno amonija sulfātu (2. pielikums). Vienam litram SD N- barotnes pievieno 800 mL destilēta ūdens. Atsevišķi pagatavo 100 mL 50 g L⁻¹ amonija sulfāta šķīduma. Visām barotnēm pēc autoklavēšanas pievienoja tetraciklīnu ar koncentrāciju barotnē 25 mg L⁻¹. Tetraciklīnu iepriekš sagatavoja kā 500 reizes koncentrētu šķīdumu 70% etilspirtā. Sintētiskajai barotnei ar adenīnu (SD+) pievienoja adenīna hemisulfātu tā, lai tā koncentrācija barotnē ir 136 mg L⁻¹. Adenīna hemisulfāta šķīdumu iepriekš sagatavo 100 reizes koncentrētu destilētā ūdenī un autoklavē. Agarizētajām barotnēm pievienoja agaru tā, lai gala koncentrācija ir 20 g L⁻¹. Agarizētās plates salej, izmantojot sterilu mērcilindru. Kvadrātveida (10cm x 10cm x 2cm) Petri traukos (ražotājs Sarstadt, Vācija) lej 50 mL agarizētās barotnes.

Inhibitorus pagatavo kā 100x koncentrētākus izejas šķīdumus. Metformīnu ar gala koncentrāciju barotnē 3,5 mM un metatreksātu ar gala koncentrāciju 4 mM šķīdina DMSO. Antimicīnu A ar gala koncentrāciju 50 mM šķīdina 96% etanolā, bet 4 mM nātrija valproātu – destilētā ūdenī. Pēc nepieciešamības inhibitora šķīdumus pievieno barotnēm.

2.3. Iekārtas un programmatūra

Darbā izmantotās iekārtas un programmatūras ir norādītas 3. tabulā.

3. tabula

Darba izstrādē izmantotās iekārtas un programmatūra.

Table 3

Used equipment and software.

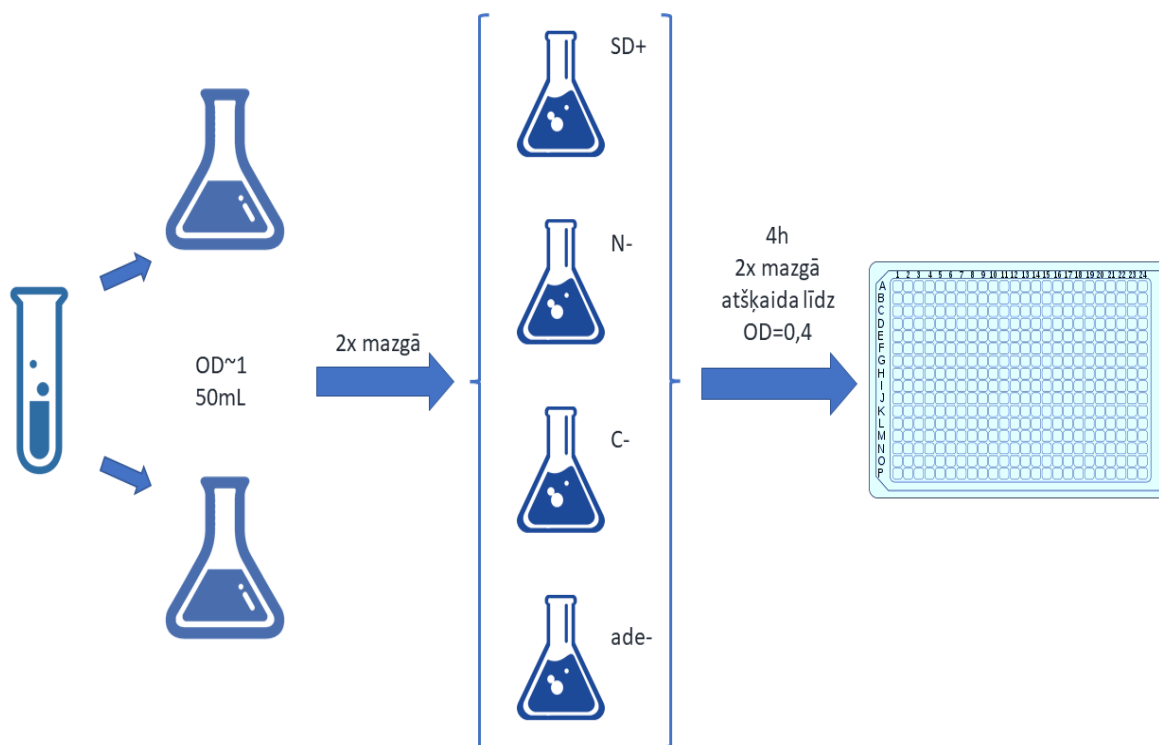
Iekārta	Modelis	Firma	Ražotāja valsts
Autoklāvs	BKQ-Z301	Biobase	Ķīna
Autoklāvs	Certoclav Classic	Certoclav	Austrija
Centrifūga	Sigma 1-16	LaboChema	Lietuva
Centrifūga	5810R	Eppendorf	Vācija
Inkubators	Herracell 240-i	Thermo Scientific	ASV
Inkubators	I 26	New Brunswick Scientific	ASV
Inkubators/krafitājs	ES-20	Biosan	Latvija
Laminārās plūsmas skapis	V 12 P	Fastflow	Itālija
Mikroplašu lasītājs	Infinite M200 PRO	Tecan	Šveice
Pipetēšanas robots	Opentron OT-2	Opentrons Labworks	ASV
Programma	Autoclick 2.0		ASV
Programma	i-control 1.10	Tecan Austria GmbH	Austrija
Programma	Irfanview 4.40 64-bit	Irfan Skiljan	Bosnija un Hercegovina
Programma	MatLab R2015a	MathWorks	ASV
Programma	Opentrons	Opentrons Labworks	ASV
Programma	Opentron Protocol Designer 5.2.6	Opentrons Labworks	ASV
Programma	RStudio 3.6.3	R Core Team	Austrija
Skeneris	CanoScan 4400r	Canon	Japāna
Spektrofotometrs	HALO VIS-20	Dynamica Scientific	Lielbritānija
Svari	ABJ	Kern & Sohn	Vācija
Šūnu skaitītājs	LUNA Fx7	Logos Biosystems	Dienvidkoreja
Svari	V-200	Acculab	ASV

2.4. Augšanas līkņu iegūšana mikroplašu lasītājā inhibitoru klātbūtnē

Visas darbības ar mikroorganismiem šī pētījuma ietvaros veiktas sterilos apstākļos laminārās plūsmas skapī, ja nav norādīts citādi. Eksperimenta plāns redzams 7. attēlā. Naktskultūrās audzētajām šūnām nomēra optisko blīvumu (OD). Šeit un turpmāk optisko blīvumu mēra ar HALO VIS-20 spektrofotometru ar viļņu garumu 600nm. Šūnas no naktskultūras pārsēj SD+ barotnē tā, lai nākamajā dienā OD~1. Lai noskaidrotu, cik daudz šūnu suspensijas jāpārsēj, to aprēķina pēc formulas:

$$V_s(\mu L) = \frac{V_B * 1000 * 2^{\frac{h}{d}}}{OD_s * OD_v},$$

kur V_s – šūnu suspensijas tilpums mikrolitros, kas jāpārsēj; V_B – barotnes tilpums kolbā, uz kuru pārsēj; h – augšanas laiks stundās; d - dalīšanās laiks stundās; OD_s – naktskultūras optiskais blīvums; OD_v – vēlamais optiskais blīvums eksperimenta sākumā. Audzēšanu veic ar vismaz diviem dažādiem dalīšanās laikiem (no 1,5 līdz 1,8h).



7. attēls. Eksperimenta plāns augšanas līkņu iegūšanai. Autora attēls.

Figure 7. Experimental set up for determination of growth curves. Author's figure.

Nākamajā dienā nomēra izaugušo šūnu kultūru optisko blīvumu. Izvēlas tās, kurām OD_{600} ir vistuvāk 1. Šūnu suspensijas ievieto 50 mL centrifūgošanas mēģenē. Centrifūgo 4 min $6000 \cdot g$. Barotni nolej. Veic šūnu mazgāšanu – šūnas resuspendē destilētā ūdenī un vorteksē, tad atkārtoti centrifūgo. Šūnu mazgāšanu kopā atkārtoti 2 reizes. Pēc pēdējās mazgāšanas šūnas resuspendē SD N- barotnē tā, lai optiskais blīvums centrifūgošanas mēģenē ir apmēram 2. Atkārtoti nomēra OD pie 600 nm. Šūnu suspensiju pārnes 100 mL kolbās ar 10 mL dažādu veidu barotnēm (SD+, N-, C- un ade-) tā, lai sākuma $OD \sim 1$ (2. pielikums). Badināšanas barotnes sagatavo no SD N- barotnes, glikozes, amonija sulfāta un adenīna hemisulfāta šķīdumiem. Barotnēs bez slāpekļa (N-) un bez oglekļa (C-) iztrūkstošā tilpuma vietā pievieno sterilu, destilētu ūdeni (2. pielikums). Šūnas inkubē 4 h, $+30^{\circ}C$, 180 rpm.

Pēc inkubācijas nomēra OD_{600} . Šūnu suspensijas pārnes 15 mL centrifūgošanas stobriņos. Centrifūgo 4 min $6000 \cdot g$. Tāpat kā iepriekš šūnas mazgā divas reizes ar sterilu, destilētu ūdeni. Pēc pēdējās mazgāšanas tās atšķaida SD+ barotnē tā, lai iegūtu vismaz 3 mL ar $OD = 0,4$. Pagatavo 2 mL 4x inhibitoru šķīdumus SD+ barotnē un 10 mL SD+ barotnes un oglekļa avotu šķīdumus (6 mL SD+ un 4 mL 20% oglekļa avota). Izmantojot Opentron OT-2 pilināšanas robotu, 384 lauciņu platē nes 40 μL SD+ barotnes un oglekļa avota šķīdumu, 20 μL šūnu suspensijas un 20 μL 4x inhibitora šķīdumus. Mikroplates bedrītē sākuma $OD = 0,1$. Opentron pilināšanas skripta piemēru var redzēt: <https://bit.ly/38LkyK3>. Katrs celms visos apstākļos audzēts vismaz 3 bioloģiskajos atkārtojumos. Kā negatīvās kontroles izmantotas dažādas barotnes bez šūnām, bet kā pozitīvā kontrole – prototrofs.

Mikroplati pirms ievietošanas mikroplašu lasītājā apvelk ar parafilmu, lai novērstu barotnes iztvaikošanu kultivācijas laikā. Tad plati ievieto mikroplašu lasītājā. Augšanas kinētikas mērījumus veic 48h $29,5^{\circ}C$. Mikroplašu lasītāja optiskā blīvuma mērīšanas cikls sastāv no 4 daļām: kratīšanas, pauzes, optiskā blīvuma mērīšanas un vēl vienas pauzes. Vispirms mikroplate tiek orbitāli kratīta 480 s, tad seko 120 s lineārā kratīšana. Abas kratīšanas veic ar amplitūdu 6 mm. Tās nodrošina homogēnu šūnu suspensiju un barības vielu izplatību barotnē. Pēc kratīšanas 3 s pauzē ļauj šūnām nosēsties. Tad seko optiskā blīvuma mērīšana pie 600 nm ar spektrālās joslas platumu 9 nm. Katrā laika punktā, ik pēc 688 sekundēm, veikti 5 mērījumi un atgriezta to vidējā vērtība. Tad ir 60 s pauze. Kratīšanas pauze pēc mērījumu veikšanas neļauj šūnām veidot agregātus.

2.4.1. Augšanas līkņu datu apstrāde

Datu apstrāde veikta Microsoft Excel programmatūrā R 3.6.3. Lag fāzes aprēķinātas izmantojot iepriekš sagatavotu R skriptu (Kassaliete, bakalaura darbs, 2020). No mikroplašu lasītājā iegūtajiem optiskā blīvuma mērījumiem atņem barotnes optisko blīvumu. Augšanas līkņu grafika eksponenciālās augšanas fāzi apraksta ar taisni. Izmantojot šo taisnes vienādojumu, aprēķināts tās krustpunkts ar x asi – lag fāzes ilgums. No visiem bioloģiskajiem atkārtojumiem aprēķināts vidējais aritmētiskais rādītājs un standartnovirzes.

Maksimālais specifiskais augšanas ātrums aprēķināts izvēloties vismaz desmit datu punktus OD intervālā no 0,05 līdz 0,40 un to naturāllogaritmu starpību dalot ar pagājušo laiku stundās. Šāds OD intervāls izvēlēts, jo tajā specifiskais augšanas ātrums mainās minimāli (Kassaliete et al., 2020). No bioloģiskajiem atkārtojumiem aprēķināts vidējais aritmētiskais un standartnovirzes. Maksimālie optiskie blīvumi (OD_{max}) aprēķināti izvēloties trīs lielākos optiskos blīvumus no katra bioloģiskā atkārtojuma, tad aprēķinot vidējo aritmētisko un standartnovirzes.

Abiem rādītājiem statistiski būtiskas atšķirības pie būtiskuma līmeņa 95% ($p < 0,05$) noteiktas ar programmatūru R 3.6.3, izmantojot ANOVA testu. Pirms ANOVA testa veikšanas ar Šapiro testu veikta datu normalitātes pārbaude. Pēc vajadzības veikta datu transformācija. Pēc tam veikts Tukey HSD tests.

2.5. Makrokoloniju augšanas dinamikas noteikšana

Šūnas ar sākotnējo $OD_{600} \sim 1$ audzētas tāpat, kā iepriekš aprakstīts 2.4. nodaļā. Šūnu kultūrai nomēra OD_{600} , un tās pārlej 15 mL stobriņā. Stobriņu centrifūgo 4 min 6000·g, barotni nolej. Divas reizes veic šūnu mazgāšanu ar destilētu ūdeni. Pēc tam šūnu kultūru atšķaida tā, lai OD būtu 0,4. Izmantojot daudzkanālu pipeti, uz agara barotnes uznes 5 μ l šūnu suspensijas tā, lai koloniju centri būtu 9 mm attālumā viens no otra.

Sagatavotās plātes bez vāciņa ievieto skenerī, kas atrodas inkubatorā +30 °C grādos. Kā plašu fotogrāfijas fonu izmanto tumšu salveti. Plašu skenēšanu veic 72 stundas, ik pa divām stundām. Pēc kultivācijas beigām iegūtos attēlus apstrādā ar MatLab izveidotu skriptu babYeast (Zīle, kursa darbs, 2021). Attēlos redzamās kolonijas tuvina aplim un automātiski nosaka tā rādīsus (μ m), kā arī aprēķina detekcijas laiku. Kolonijas augšanas ātrumu aprēķina kā rādīusa izmaiņu laikā. No skripta babYeast iegūst katras kolonijas pieauguma ātrumu un detekcijas laikus.

Abiem rādītājiem statistiski būtiskas atšķirības pie būtiskuma līmeņa 95% ($p < 0,05$) noteiktas ar programmatūru R 3.6.3, izmantojot ANOVA testu. Pirms ANOVA testa veikšanas ar Šapiro testu veikta datu normalitātes pārbaude. Pēc vajadzības veikta datu transformācija. Tad veikts Tukey HSD tests. Aprēķināti vidējie aritmētiskie un standartnovirzes.

2.6. Enzīmu aktivitātes noteikšana ar INT formazānu

2.6.1. Šūnu suspensijas un reakcijas maisījuma sagatavošana

Vispirms pagatavo izejas 1 M Tris-HCl buferi. Veic pH titrēšanu tā, lai pH būtu 8,4. Buferi uzglabā saldējot -20°C . Pirms katra eksperimenta pagatavo 0,2 M Tris-HCl buferi. Pagatavo 5 mg mL^{-1} saponīna šķīduma destilētā ūdenī.

Strauji augošās šūnas ar sākotnējo OD $\sim 1,5$ iegūst tāpat kā aprakstīts iepriekš 2.4. nodaļā. Katru celmu 50 mL audzē ar vismaz 2 dažādiem dalīšanās laikiem (1,5 h - 1,8 h).

Lai noskaidrotu enzīmu aktivitāti, vispirms sagatavo 5 ml ar pārbaudāmā enzīma reakcijas šķīdumiem. Visus reakcijas šķīdumus atšķaida 0,2 M Tris-HCl buferī (pH = 8,4) (4. tabula). α -ketoglutarāta dehidrogenāzes mērījumiem pagatavo koenzīma A un NAD^{+} šķīdumu.

4. tabula

Enzīmu reakciju šķīdumi

Table 4.

Solutions for enzyme reactions.

Viela	Koncentrācija	Enzīms
NAD^{+}	2 mM	Visi darbā aplūkotie
Koenzīms A	2 mM	α - ketoglutarāta dehidrogenāze
Izocitronskābe	15 mM	Izocitrāta dehidrogenāze
Hidroksidzintarskābe	15 mM	Malāta dehidrogenāze
α - ketoglutarāts	15 mM	α - ketoglutarāta dehidrogenāze

Eksperimenta sākumā nomēra izaugušās šūnu suspensijas optisko blīvumu. Izvēlas to kultūru, kuras optiskais blīvums ir vistuvāk 1,5. Suspensiju pārlej 50 mL stobrā un centrifūgo 10000 rpm, 4 min, + 4 °C. Pēc tam nolej supernatantu un šūnas divreiz mazgā ar sterilu, destilētu ūdeni. Pēc pēdējās mazgāšanas rauga šūnas resuspendē 0,2 M Tris-HCl buferī, tā lai optiskais blīvums būtu apmēram 6. Atkārtoti nomēra optisko blīvumu. Mikromēģenēs nes 1 mL šūnas suspensijas un veic divus divkārtīgus sērijveida atšķaidījumus tā, lai katrā mikromēģenē ir 0,5 mL šūnas suspensijas ar atšķirīgu OD. Katram celmam veic divus šādus atšķaidījumus. Katrai mikromēģenei pievieno 40 µL proteāžu inhibitora. Proteāžu inhibitoru cOmplete Mini (25x) pagatavo 1 tableti izšķīdinot 2 mL sterila, destilēta ūdens. Pēc vajadzībad uzglabā -20 °C. Mikromēģenēs pievieno 500 µL saponīna šķīduma. Mēģenes vorteksē. Liek inkubēties +30 °C 30 min. Tikmēr pagatavo 15 mL INT-PMS šķīdumu (5. tabula).

5. tabula

INT-PMS šķīduma pagatavošana

Table 5

Preparation of INT-PMS solution

Viela	Koncentrācija	Tilpums
INT	30 mg mL ⁻¹ (96% etanols)	300 µL
PMS	10 mg mL ⁻¹ (H ₂ O)	30 µL
Tris-HCl buferis	0,2 M	14,37 mL

Pēc inkubācijas beigām šūnas centrifūgo 13000 rpm, 3 min. Supernatantu nosūc ar vakuuma sūkni. Šūnas divas reizes mazgā ar 0,2 M Tris-HCl buferi. Pēc šūnas resuspendē 1mL Tris-HCl bufera. Tad 96 lauciņu mikroplatē, vienā bedrītē pilina 120 µL INT-PMS šķīduma un 40 µL sagatavotās šūnu suspensijas. Mikroplati ievieto mikroplašu lasītājā TECAN M200 PRO. Katrai šūnu suspensijas mikromēģenei nomēra OD₆₀₀ un ar šūnu skaitītāju LUNA Fx7 saskaita šūnas.

2.6.2. Enzīmu aktivitātes mērījumi un datu apstrāde

Pirms mērījumu uzsākšanas, mikroplašu lasītāja TECAN M200 PRO injektorus ievieto reakcijas substrātā vai elektronu akceptora šķīdumā un atgaiso. Reakcijas sākumā mikroplatē, vienā bedrītē, ir 40 µL šūnu suspensijas, 20 µL substrāta, 20 µL elektrona akceptora un 120 µL Tris-HCl bufera. Mērījumus veic tā, kā redzams 6. tabulā. Pēc mērījumu veikšanas mikroplašu lasītāja injektorus izskalo ar destilētu ūdeni un izpūš lieko ūdeni.

Datu apstrāde veikta Microsoft Excel. Laiku pārveido uz minūtēm. No iegūtajām absorbcijas līknēm atņem pirmā laika punkta vērtību, tad absorbcijas līknes lineāro daļu pielīdzina taisnei un iegūst tās virziena koeficientu. Virzienu koeficientu dala ar INT-formazāna ekstincijas koeficientu un reizina ar šūnu sauso svaru mL⁻¹.

Statistiski būtiskas atšķirības starp celmiem pie būtiskuma līmeņa 95% (p<0,05) noteiktas ar programmatūru R 3.6.3, izmantojot ANOVA un Tukey HSD testus. Pirms ANOVA testa veikšanas ar Šapiro testu veikta datu normalitātes pārbaude. Pēc vajadzības veikta datu transformācija. Aprēķināti vidējie aritmētiskie un standartnovirzes.

6. tabula

Enzīmu aktivitātes mērīšanas parametri.

Table 6

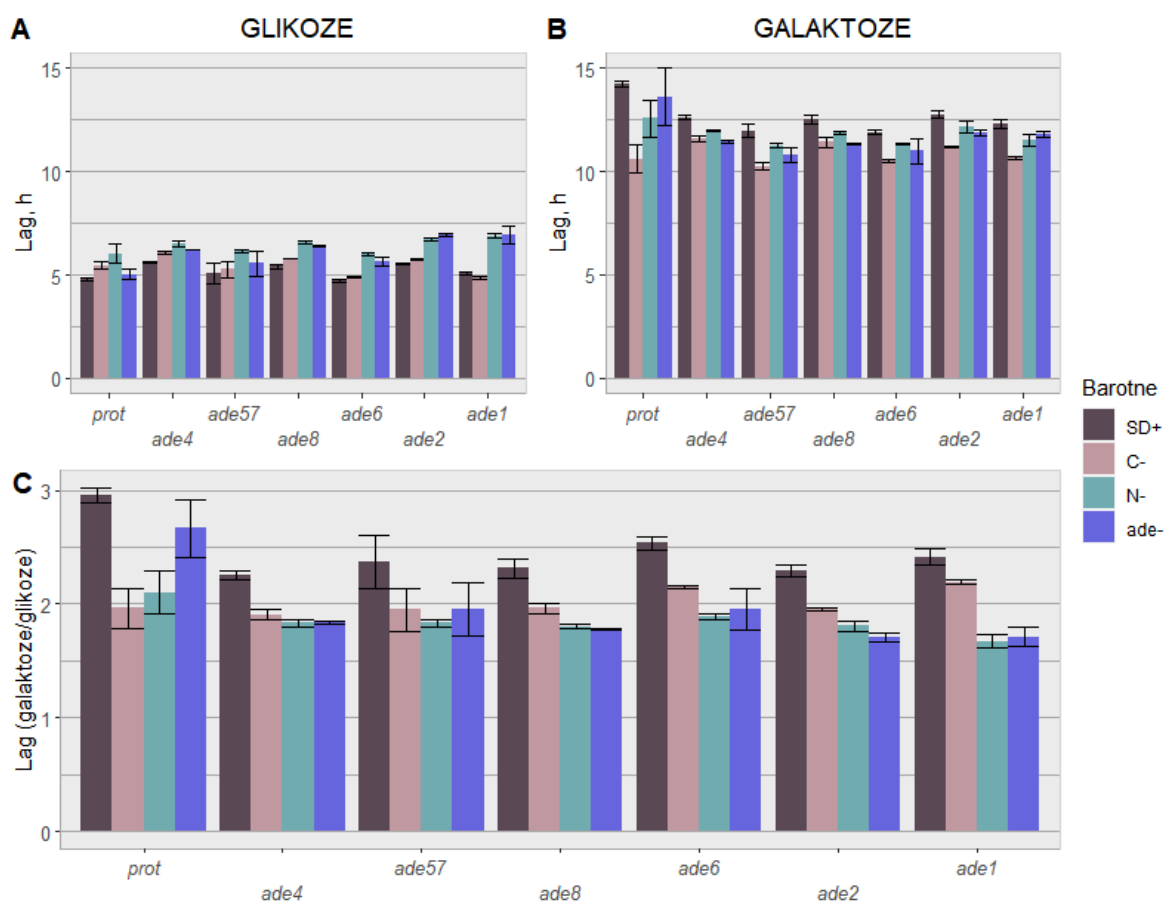
Parameters for enzyme activity measurements.

1.	Sākotnējās absorbcijas mērījumi	
	Ciklu skaits	5
	Intervāls starp cikliem	90 s
	Spektrālās joslas platums	9 mm
	Viļņu garums	490 nm
	Mērījumu skaits	25
2.	Substrātu pievienošana	
	Injektors A	20 µL
	Injektors B	20 µL
	Pievienošanas ātrums	200 µL s ⁻¹
	Injektora uzpildīšanas ātrums	100 µL s ⁻¹
	Injektora uzpildes tilpums	500 µL
3.	Kratīšana	
	Kratīšanas ilgums	5 s
	Orbitālā amplitūda	2,5 mm
4.	Absorbcijas mērīšana	
	Kinētisko ciklu skaits	40
	Intervāls starp cikliem	90 s
	Viļņa garums	490 nm
	Spektrālās joslas platums	9 nm
	Mērījumu skaits	25
	Pauze	38 ms
5.	Plates izņemšana	

3. REZULTĀTI

3.1. Alternatīvo oglekļa avotu patēriņš

Laboratorijā iepriekš novērots, ka daži strauji augoši purīnu auktotrofi glikozes klātbūtnē nepatērē skābekli (Ozoliņa, npublicēti, 2022). Šis novērojums lika secināt, ka mutācijas purīnu biosintēzes ceļā ietekmē mitohondriju metabolismu. Lai noskaidrotu izmainītās elpošanas ietekmi uz oglekļa patēriņa fenotipu, vispirms laboratorijā veikti oglekļa avota maiņas eksperimenti (8. attēls; 3. pielikums). Šūnas sagatavotas tāpat kā 2.4. nodaļā, ar Opentron OT-2 pipetēšanas robotu sapilināta 96 lauciņu plate ar glikoze vai galaktozi kā oglekļa avotu un kultivētas mikroplašu lasītājā TECAN Infinite M200 PRO.



8. attēls. Purīnu biosintēzes ceļa mutantu oglekļa maiņa. **A.** Lag fāzes ilgums (Lag, h) barotnē ar glikozi. **B.** Lag fāzes ilgums (Lag, h) barotnē ar galaktozi. **C.** Lag fāžu attiecība galaktoze : glikoze. Ozoliņa, 2022, npublicēti.

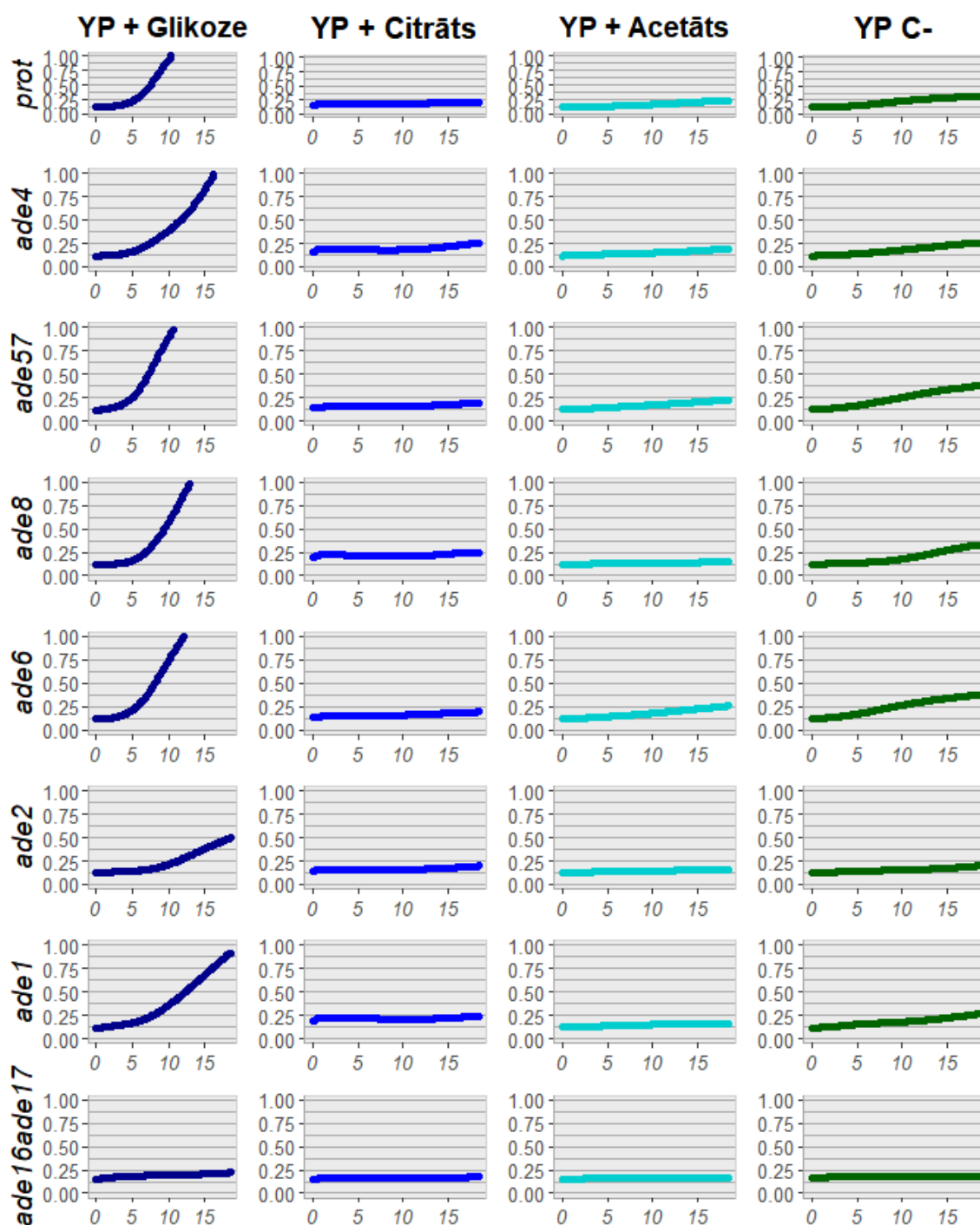
Figure 8. Carbonshift in purine biosynthesis mutants. **A.** Duration of lag phase in media with glucose. **B.** Duration of lag phase (Lag, h) in media with galactose. **C.** Ratio of lag phases galactose : glucose. Ozoliņa, 2022, unpublished.

Visi celmi, kas iepriekš audzēti N- un ade- barotnēs, barotnē ar glikozi uzrādīja lielākas lag fāzes nekā tie, kuri iepriekš auguši SD+ barotnē (8A. attēls). Barotnē ar galaktozi celmi uzrādījuši garākās lag fāzes, ja tie iepriekš auguši pilnajā SD+ barotnē (8B. Attēls). Vismazākā galaktozes un glikozes barotnes lag fāžu attiecība ir novērojama badinātajām šūnām: C-, N-, ade- (8C. attēls).

Lai noskaidrotu purīnu biosintēzes ceļa mutāciju ietekmi uz elpošanas metabolismu, laboratorijā veiktas audzēšanas uz oksidatīvajiem oglekļa avotiem. Oksidatīvo substrātu patēriņam nepieciešama aktīva mitohondrija iesaiste. Oksidatīvos substrātus nevar katabolizēt fermentējot, bet var oksidējot (Isakova et al., 2020). Ja *S. cerevisiae* ir traucējumi kādā no mitohondrionālajiem procesiem – Krebsa cikls, elektrona transporta ķēde –, novēro augšanas kavēšanos uz oksidatīvajiem substrātiem. Iepriekš sintētiskajā (SD) barotnē ar glikozi izaudzētas šūnas, divreiz nomazgātas, resuspendētas attiecīgajā barotnē un kultivētas mikroplatē. Laboratorijā pārbaudījām raugu augšanu uz acetāta, glikozes un citronskābes rauga ekstrakta-peptona barotnē (YP) (9. attēls) un sintētiskajā (SD) barotnē (4. pielikums).

YP barotnes rezultāti (9. attēls) demonstrē, ka raugu augšana notiek gan glikozes klātbūtnē, gan YP C-; tā ir barotne, kur par galveno oglekļa avotu kalpo rauga ekstrakts un baktopeptons. Savukārt, daļai no purīnu sintēzes mutantu (*adel* un *adel6ade17*) augšanu inhibē acetāta klātbūtne. Tā kā šūnu kultūras audzētas YP barotnē, kurā papildus pieejams adenīns, iegūtie rezultāti nav saistīti ar tiešu purīnu auktrofiju, kad augšana ir apstājusies, jo barotnē beidzies adenīns, bet gan ar kādu citu fizioloģisko funkciju, kurā iesaistīti purīnu biosintēzes ceļa gēni.

Veicot oksidatīvo substrātu augšanas eksperimentu sintētiskajā barotnē (SD) barotnes, atšķirības augšanā vairs nenovēro (4. pielikums). Šis netieši norāda uz to, ka YP barotnē ir barības vielas, kas nepieciešamas kādai citai rauga metaboliskajai funkcijai, kuras realizēšana purīnu auktrofos ir traucēta.



9. attēls. *S. cerevisiae* augšana līknes uz glikozes, oksidatīvajiem substrātiem (citrāts un acetāts) un barotnē bez papildus pievienota oglekļa avota (YP C-) rauga ekstrakta-peptona barotnē (YP). Uz x ass attēlots augšanas laiks stundās, bet uz y ass – optiskais blīvums pie 600 nm. Attēls no Ozoliņa, 2022, nepublicēti.

Figure 9. The growth curves of *S. cerevisiae* in yeast extract-peptone media (YP) with added glucose, oxidative substrates (citrate and acetate) and without additionally added carbon source (YP C-) On x axis is displayed time of growth in hours, but on y axis – optical density at 600 nm. Figure from Ozoliņa, 2022, unpublished.

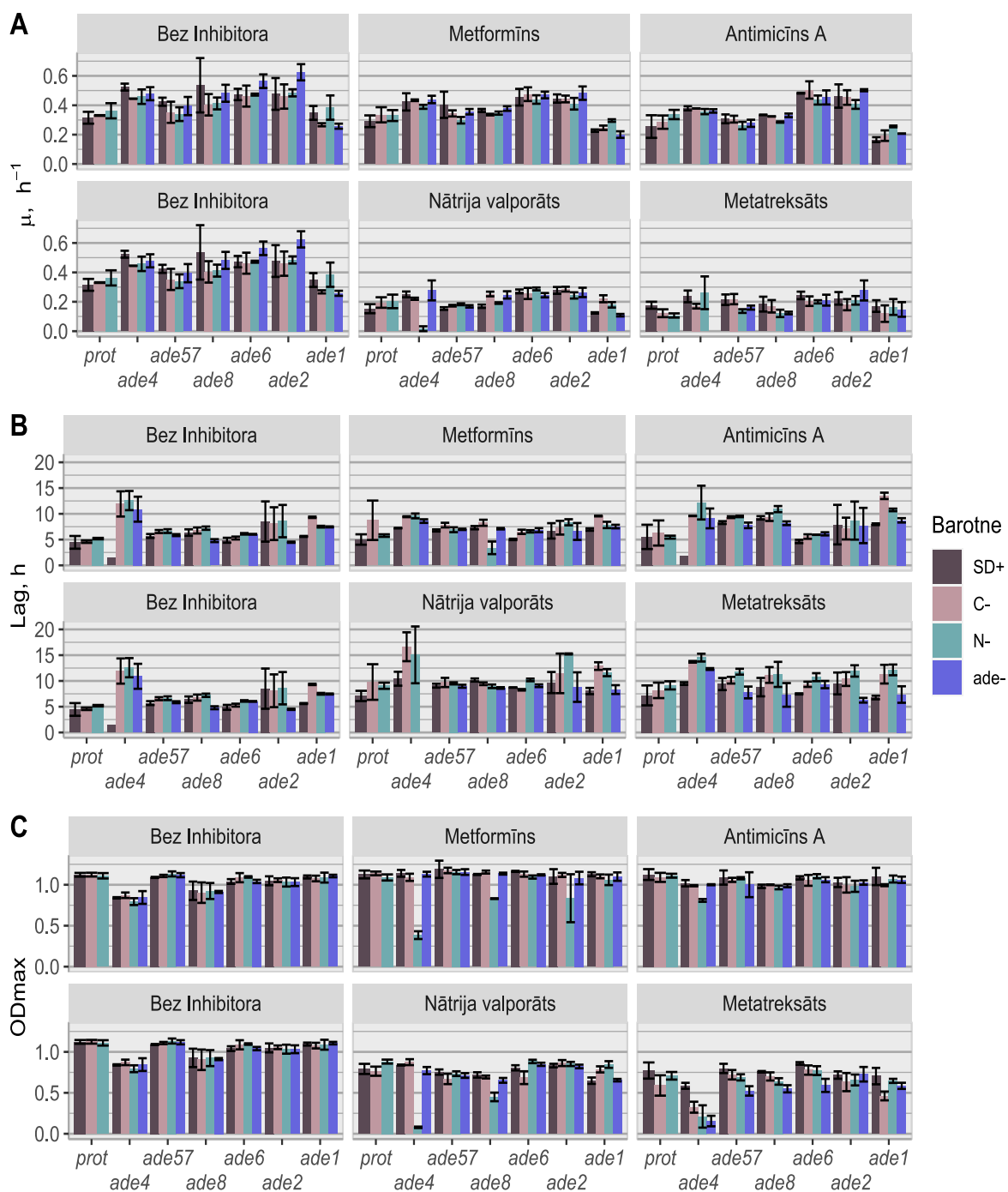
3.2. Augšana mitohondrionālo inhibitoru klātbūtnē

Pēc tam, lai noskaidrotu, kurš tieši mitohondriju bioķīmiskais process ir izmainīts purīnu auktrofijas gadījumā, veiktas mikrokultivācijas dažādu inhibitoru klātbūtnē. No augšanas līknēm aprēķināja specifisko augšanas ātrumu μ , lag fāzes ilgumu un sasniegto, maksimālo optisko blīvumu OD_{max} (10. attēls).

Vislielākos specifiskos augšanas ātrumus uzrādīja celmi bez inhibitora klātbūtnes (10A. attēls). Metformīna un antimicīna A klātbūtnē augšanas ātrumi ir nedaudz mazāki kā bez inhibitora; nav novērojamas atšķirības starp iepriekš badinātām vai nebadinātām šūnu kultūrām. Bez inhibitora klātbūtnes lielākos augšanas ātrumus uzrādīja *ade2* un *ade6* mutanti, kas iepriekš auguši barotnē bez pievienota adenīna. Antimicīna A klātbūtnē vislielākos specifiskos augšanas ātrumus uzrāda *ade2* un *ade6* gēnu mutanti, šie augšanas ātrumi ir lielāki nekā prototrofam. Vismazākie augšanas ātrumi ir nātrija valproāta un metatreksāta klātbūtnē. *ade4* N- celms nātrija vaproāta klātbūtnē un *ade-* metatreksāta klātbūtnē auguši vislētāk.

Visgarākās lag fāzes novērojām badinātam *ade4* celmam visos apstākļos (10B. attēls). Metformīna klātbūtnē lag fāzes lielākoties ir garākas. Veicot kultivācijas ar antimicīnu A, visīsākās lag fāzes novērojamas *ade6* celmam. Nātrija valproāta klātbūtnē lag fāzes ir ilgākas, sasniedzot apmēram 9h. Arī metatreksāta klātbūtnē lag fāzes ir garākas nekā bez inhibitora audzējot. Purīnu biosintēzes ceļa mutantiem *ade57*, *ade8*, *ade2* iepriekš purīnu badinātas šūnas uzrādījušas īsākas lag fāzes nekā pilnajā barotnē (SD+) augušās vai oglekļa/slēpekļa badinātās.

Darbā izmantotie inhibitori – metformīns un metatreksāts – šķīdināti dimetilsulfoksīdā (DMSO). DMSO ir organisks savienojums, kam piemīt oksidatīvas īpašības. Gala barotnē tā koncentrācija ir 1%, šī koncentrācija ir pārāk maza, lai tā klātbūtnē izraisītu fenotipiskas atšķirības (Sadowska-Bartosz et al., 2013). Arī šajā darbā 1% DMSO kontroles neuzrādīja atšķirības starp tiem pašiem celmiem, kas auguši barotnē bez DMSO. Lai celmam izraisītu augšanas traucējumus būtu nepieciešama vismaz 6% DMSO koncentrācija (Sadowska-Bartosz et al., 2013).



10. attēls. *S. cerevisiae* purīnu *de novo* ceļa mutantu un izejas celma augšanas parametri SD barotnē ar glikozi – **A.** specifiskais augšanas ātrums μ, h^{-1} . **B.** lag fāzes ilgums, h; **C.** maksimālais sasniegtais optiskais blīvums – inhibitoru klātbūtnē. Celmi sakārtoti purīnu *de novo* sintēzes ceļa secībā. Nogriežņi attēlo standartnovirzes.

Figure 10. The growth parameters – **A.** specific growth rate μ, h^{-1} ; **B.** lag phase, h; **C.** maximal optical density – of *S. cerevisiae* purine *de novo* pathway mutants and prototroph in SD media with glucose and mitochondrial inhibitors present. Strains are shown in order of purine *de novo* synthesis pathway. Bars denote standard deviations.

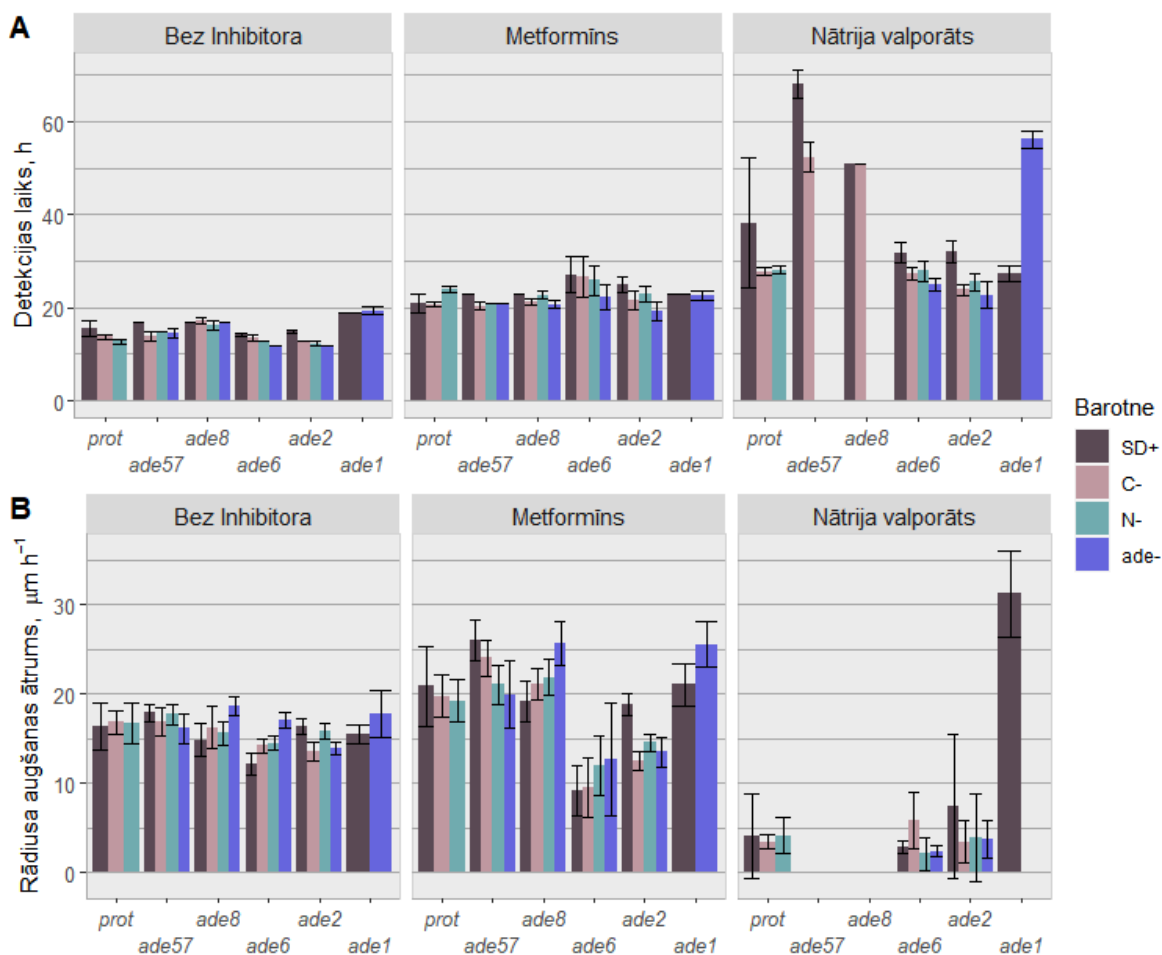
Šķidrās barotnes kultivācijās bez inhibitora un ar pievienotu metformīnu vai antimicīnu A lielākā daļa celmu sasnieguši $OD_{max} \sim 1,1$ (10C. attēls). Šis rādītājs neliecina par augšanas efektivitāti (angl. – *efficiency of growth*), bet gan norāda uz šūnu kultūras piesātinājumu un mērīšanas iekārtas limitu. Šūnu kultūra, visticamāk, turpina augt, bet to mērierīce vairs nespēj detektēt. Pārāk biežās šūnu kultūrās iespējama arī otrreizējā gaismas atstarošana, kas ietekmē nomērīto optisko blīvumu (Stevenson et al., 2016). Metformīna un nātrija valproāta klātbūtnē vismazākos OD_{max} uzrādījis *ade4* N- šūnas. Arī *ade8* N- šūnas metformīna un nātrija valproāta ietekmē sasniedzis zemāku maksimālo optisko blīvumu nekā tad, kad audzētas savādākās barotnēs. Metatreksāta klātbūtnē mazāki OD_{max} sasniegti, ja šūnas ir iepriekš badinātas, bet lielāki, ja tās augušas pilnajā barotnē. Kultivācijās ar metatreksātu vismazākie OD_{max} ir *ade4* mutantam.

Šādu pašu audzēšanu atkārtojām par oglekļa avotu izmantojot galaktozi (5. pielikums). Bez inhibitora barotnē ar pievienotu galaktozi specifiskie augšanas ātrumi ir lielāki purīnu biosintēzes ceļa mutantiem, bet tie neatšķiras starp iepriekšējiem augšanas apstākļiem. Badinātiem purīnu ceļa mutantiem novērojamas īsākas lag fāzes kā tiem, kas pirms tam auguši pilnajā barotnē. Metformīna klātbūtnē mazākos OD_{max} novēro slāpekļa badinātiem purīnu auktrotrofiem. Divu dienu kultivācijās ar nātrija valproātu, metatreksātu gandrīz visu celmu sasniegtie OD_{max} ir tik niecīgi, kas nav iespējams aprēķināt lag fāzi un/vai specifisko augšanas ātrumu. Antimicīna A klātbūtnē uz galaktozes augšana novērojama tikai prototrofam un *ade2*, *ade6* mutantiem.

3.3. Koloniju kultivēšana un augšanas dinamikas reģistrēšana

Lai novērtētu augšanu ilgākā laika posmā uz agarizētās barotnes, veicām koloniju augšanas dinamikas mērījumus (11. attēls). Kultivācijas veiktas bez inhibitora, kā arī metformīna, nātrija valproāta un metatreksāta klātbūtnē (6. pielikums). Koloniju audzēšana ar pievienotu antimicīnu A netika veikta. Neviens celms, ieskaitot purīnu prototrofu, metatreksāta klātbūtnē 72h laikā neizauga un nebija detektējams.

Bez inhibitora klātbūtnē uz agara barotnes, tāpat kā šķidrā barotnē lag fāzēm (10. attēls), nav novērojamas atšķirības starp detekcijas laikiem un iepriekšējai augšanas apstākļiem (11. attēls). Bez inhibitora klātbūtnes vislielākais detekcijas laiks ir *ade1* celmam $19,40 \pm 0,89$ h. Visīsākie detekcijas laiki novērojami gēnu mutantiem pirms *ade1* gēna – *ade2* un *ade6*. Metformīna klātbūtnē visilgākais detekcijas laiks ir tieši *ade6* mutantiem. Kultivējot ar nātrija valproātu, visgarāko detekcijas laiku uzrādīja *ade57* un *ade8* celmi, kuri kļuva detektējami pēc vairāk kā 48h. Ja šie celmi iepriekš tikuši slāpekļa vai purīnu badināti, tad tie nav detektējami arī pēc 72h. Mutanti *ade6* un *ade8* barotnē ar nātrija valproātu, līdzīgi kā šķidrā kultivācijā (10. attēls), uzrāda īsākus detekcijas laikus, ja iepriekš tikuši badināti.



11. attēls. Purīnu auksotrofu kolonijas dinamikas parametri mitohondrionālo inhibitoru klātbūtnē. **A.** Kolonijas detekcijas laiks stundās. **B.** Rādiusa augšanas ātrums mikrometros stundā. Celmi sakārtoti purīnu *de novo* sintēzes ceļa secībā. Nogriežņi norāda standartnovirzes.

Figure 11. Colony growth parameters of purine auxotrophs cultivated with mitochondrial inhibitors. **A.** Time of colony detection, hours. **B.** Growth of the colony radius, micrometers per hour. Strains are shown in order of purine *de novo* synthesis pathway. Bars denote standard deviations.

Vismazākais rādiusa augšanas bez inhibitoru klātbūtnes ir *ade6* mutantam ($12,15 \pm 1,16 \mu\text{m h}^{-1}$). Izņemot visus *ade6* un *ade2* badinātos mutantus, metformīna klātbūtnē koloniju radiālie augšanas ātrumi ir lielāki nekā barotnē bez inhibitora. Vislielākos koloniju augšanas ātrumus uzrādīja *ade57* SD+ ($26,01 \pm 2,34 \mu\text{m h}^{-1}$) un *ade8* ade- ($25,63 \pm 2,46 \mu\text{m h}^{-1}$) mutanti.

Nātrija valproāta klātbūtnē *ade57* un *ade8* mutantiem nebija iespējams aprēķināt radiālos augšanas ātrumus. Visiem celmiem, izņemot *ade1* SD+, koloniju augšanas ātrumi bija izteikti mazi ap $5 \mu\text{m h}^{-1}$.

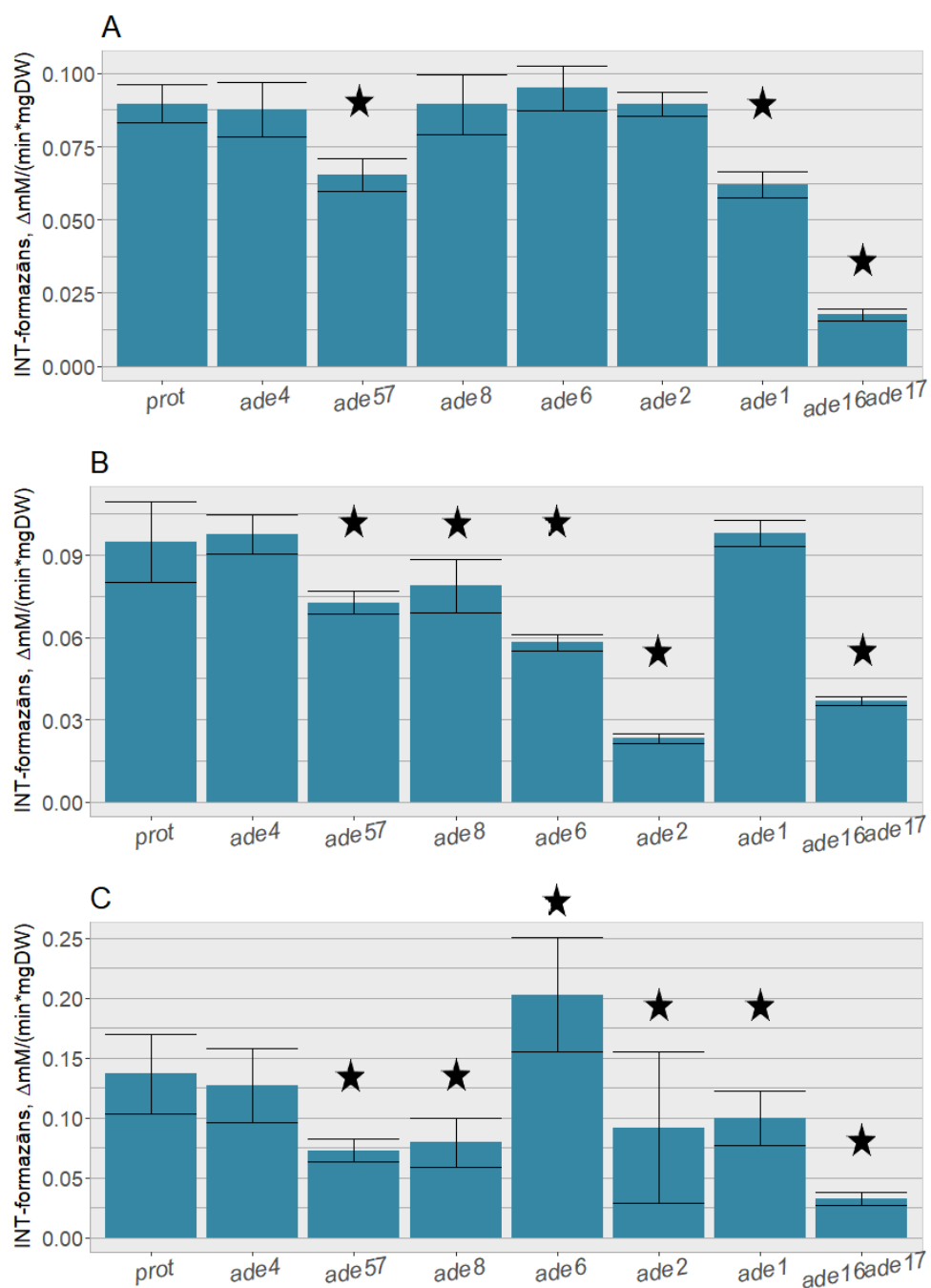
3.4. Krebsa cikla enzīmu aktivitāte

Lai sīkāk izpētītu oglekļa metabolismu, mērīti Krebsa cikla enzīmi (12. attēls): izocitrāta dehidrogenāze, α -ketoglutarāta dehidrogenāze un malāta dehidrogenāze (6. pielikums). Mērījumi veikti permabilizētās šūnās, izmantojot INT-formazāna redukcijas testu.

Krebsa cikla trešo soli katalizē izocitrāta dehidrogenāze. Šī enzīma aktivitāte statistiski būtiski neatšķīrās (būtiskuma līmenis 95%) starp lielāko daļu no celmiem (13A. attēls). Viszemāko aktivitāti uzrādīja *ade16ade17* dubultmutants ($0,018 \pm 0,002 \Delta\text{mM min}^{-1} \text{mgDW}^{-1}$). No prototrofa izocitrāta dehidrogenāzes aktivitāte ir statistiski būtiski ($p < 0,05$) mazāka *ade57* un *ade1* mutantiem, bet savstarpēji tās būtiski neatšķīras.

Nākamo soli Krebsa ciklā katalizē α -ketoglutarāta dehidrogenāze. Izejas celmam CEN.PK 113-7D tā aktivitāte (12B. attēls) ir $0,095 \pm 0,015 \Delta\text{mM INT-formazāna minūtē uz miligramu sausā svara (DW)}$. Viszemāko aktivitāti uzrādīja Δ *ade2* mutants ($0,023 \pm 0,002 \Delta\text{mM min}^{-1} \text{mgDW}^{-1}$). Līdz *ADE2* gēnam jo tālāk purīnu biosintēzes ceļā atrodas gēna kodētais enzīms, jo mazāka ir tā aktivitāte.

Malāta dehidrogenāze ir Krebsa cikla enzīms, kas katalizē tā pēdējo soli. Prototrofa malāta dehidrogenāzes aktivitāte (12C. attēls) ir $0,137 \Delta\text{mM INT-formazāna minūtē uz miligramu sausā svara (DW)}$. Vislielāko malāta dehidrogenāzes aktivitāti ($0,203 \pm 0,048 \Delta\text{mM min}^{-1} \text{mgDW}^{-1}$) uzrādīja *ade6* mutants, bet vismazāko ($0,203 \pm 0,048 \Delta\text{mM min}^{-1} \text{mgDW}^{-1}$) – *ade16ade17* mutants. Mutanta *ade6* aktivitāte ir lielāka izejas celmam. Visi mutanti, izņemot *ade4*, statistiski būtiski atšķīrās no prototrofa ($p < 0,05$).



12. attēls. *S. cerevisiae* prototrofa un purīnu biosintēzes ceļa mutantu **A.** izocitrāta dehidrogenāzes; **B.** α -ketoglutarāta dehidrogenāzes; **C.** malāta dehidrogenāzes aktivitāte. Celmi sakārtoti purīnu *de novo* sintēzes ceļa secībā. Nogriežņi attēlo standartnovirzes. Zvaigznītes simbolizē statistiski būtiskas atšķirības no prototrofa ($p < 0,05$).

Figure 12. The activity of **A.** isocitrate dehydrogenase; **B.** α -ketoglutarate dehydrogenase; **C.** malate dehydrogenase in *S. cerevisiae* purine biosynthetic pathway mutants and prototroph. Strains are shown in order of purine *de novo* synthesis pathway. Bars denote standard deviations. The stars denote statistically significant differences from prototroph ($p < 0,05$).

4. DISKUSIJA

Šajā darbā aplūkotas mitohondriālā metabolisma izmaiņas purīnu auktrotrofiem *S. cerevisiae* celmiem. *S. cerevisiae* ir *crabtree* pozitīvs raugs, kas izvēlas glikozi fermentēt pat skābekļa klātbūtnē. Tam ir salīdzinoši vairāk glikozes transporteru, kuri nodrošina lielu glikozes uzņemšanas ātrumu (Hagman et al., 2013). Fermentācijas laikā *S. cerevisiae* iegūst kopumā mazāk, bet īsākā laikā ATP molekulas, jo oglekļa metabolisma plūsmas ir lielākas nekā elpojot (Thomsson et al., 2003; Pfeiffer et al., 2014). Fermentēšana ļauj *S. cerevisiae* iegūt priekšrocības pār citiem, konkurējošiem eikariotiem, ko tas, iespējams, nespētu, izmantojot respiratoro metabolismu. *S. cerevisiae* šūnas elpošanas procesā no vienas glikozes molekulas iegūst ~ 18 ATP, lai gan lielākā daļa eikariotu spēj iegūt ~38 ATP molekulas (Pfeiffer et al., 2014). Tāpat fermentācijas procesā saražotais etanols ir toksisks citām iespējamām, tuvumā esošajām sugām (Van Uden, 1985).

Neskatoties uz daudzām fermentēšanas priekšrocībām, iepriekš laboratorijā esam novērojuši, ka atsevišķiem purīnu auktrotrofiem atšķiras skābekļa patēriņš (Ozoliņa, nepublicēti, 2022). Jau iepriekš Petti un kolēģi (2011) parādījuši, ka metionīna auktrotrofiem respiratorā metabolisma aktivācija var nesniegt enerģētiskus ieguvumus, bet gan nodrošināt šūnu izdzīvotību. Līdzīgi Matecic un kolēģi (2010) norāda, ka mutācijas purīnu biosintēzes gēnos ir saistītas ar lielāku izdzīvotību, bet Tahara un kolēģi (2013) parādījuši, ka palielināta respiratorā aktivitāte palielina *ADE* gēnu mutantu izdzīvotību.

Lai noskaidrotu purīnu auktrotrofijas izraisītās izmaiņas mitohondriālajā metabolismā, iepriekš laboratorijā veiktas audzēšanas uz dažādiem fermentējamiem (8. attēls), kā arī oksidatīvajiem oglekļa avotiem (9. attēls).

4.1. Purīnu mutācijas paātrina alternatīvā C avota izmantošanu

Visiem darbā izmantotajiem celmiem, neatkarīgi no iepriekšējiem augšanas apstākļiem, ir novērojamas garākas lag fāzes augot uz galaktozes nekā uz glikozes (8. attēls). To var izskaidrot ar šūnu augšanas vēsturi HDB (angl. – *history-dependent behaviour*) (Vermeersch et al., 2019). Lag fāzes būs īsākas, ja šūnas augušas, izmantojot to pašu oglekļa avotu. Pirms kultivācijas uz glikozes vai galaktozes mikroplatē šūnas audzētas glikozes klātbūtnē vai bez tās (C-). Galaktozes transporteru trūkums var izraisīt garākas lag fāzes (Cerulus et al., 2018). Stockwell un kolēģi (2015) novērojuši, ka pirmreizēja audzēšana uz galaktozes izraisa lēnu galaktozes transporteru un metabolisma gēnu indukciju. Šī indukcija kļūst ātrāka, ja oglekļa avots tiek patērēts atkārtoti. Tomēr līdzīgā pētījumā Perez-Samper un kolēģi (2018) aplūkojuši *S. cerevisiae* pāreju no glikozes un maltozes un atklājuši, ka transportieri ir nepieciešami, lai izietu no lag fāzes, bet tie var arī nebūt limitējošais solis.

Pielāgošanās laiks jaunam oglekļa avotam ir atkarīgs no šūnu iepriekšējās barotnes, nevis tā, kur šim celmam adenīna sintēzes ceļā ir mutācija (8. attēls). Vislielākais pielāgošanās laiks visiem šajā darbā izmantotajiem celmiem jaunam oglekļa avotam ir pilnajā, sintētiskajā barotnē (SD+) augošajām šūnām (8C. attēls). To var izskaidrot ar glikozes klātbūtni barotnē un tās izraisīto respiratorā metabolisma inhibīciju. Perez-Samper un kolēģi (2018) noskaidroja, ka lag fāzes ilgums pārslēdzoties ir atkarīgs no respiratorā metabolisma aktivācijas. *S. cerevisiae* ir *crabtree* pozitīvs raugs. *Crabtree* efekts ir organisma spēja fermentēt glikozi pat skābekļa klātbūtnē. *Crabtree* pozitīviem raugiem ir augsts glikozes uzņemšanas ātrums, un no uzņemtās glikozes tiek ražots etanols (Hagman et al., 2013). Fermentācijas laikā respiratorais metabolisms ir inhibēts. Kad glikoze vairs nav pieejama, *S. cerevisiae* enerģijas iegūšanai izmanto safermentēto etanolu (Stahl et al., 2014). Šo pāreju no fermentatīvā uz resperatīvo metabolismu sauc par diauksiju (De Deken, 1966). Neaktivizējot respiratoro metabolismu, šūnas joprojām spēj izkļūt no lag fāzes, bet tā būs garāka (Perez-Samper et al., 2018). Garākas lag fāzes pārslēdzoties uz galaktozes patēriņu var izskaidrot ar nepieciešamību aktivizēt respiratīvo metabolismu.

Atšķirības lag fāžu ilgumos ir iespējams izskaidrot ne tikai ar atšķirībām oglekļa metabolismā, bet arī ar atšķirīgu elpošanā iesaistīto proteīnu iekššūnas koncentrācijām pat šūnās, kas nākušas no vienas populācijas un ir ģenētiski identiskas. Šūnām ne vienmēr ir izdevīgi uzreiz un vienlaicīgi ar citām šūnām pielāgoties jaunajai videi (Vermeersch et al., 2019). Šūnu lag fāzes laiku ietekmē arī epiģenētiskie faktori, kas mantoti no mātes šūnas. *S. cerevisiae* meitšūnu lag fāzes parasti ir lielākas nekā mātšūnas. Atsevišķu šūnu epiģenētiskā atšķirība un tās ietekme uz dalīšanās laiku izskaidro līdz pat 7% no kopējās populācijas augšanas ātruma (Cerulus & New et al., 2016).

Oglekļa badinātās (C-) šūnas uzrādīja ātrāku pāreju uz galaktozi kā oksidatīvo oglekļa avotu nekā iepriekš SD+ barotnē augošās šūnas (8C. attēls). To var izskaidrot ar glikozes represijas neesamību. Glikozes represija ir fenomens, kad glikozes klātbūtne barotnē *S. cerevisiae* inhibēs resperatīvo metabolismu un citu oglekļa avotu izmantošanu (Kayikci & Nielsen, 2015). Šūnām, kas augušas bez glikozes (C-), netiek inhibēta citu oglekļu avotu izmantošana, līdz ar to tie spēj ātrāk uzsākt augšanu uz galaktozes.

Atsevišķi slāpekļa badināti purīnu biosintēzes ceļa mutanti (*ade8*, *ade6*, *ade2*, *ade1*) glikozē uzrādīja garākas lag fāzes kā pilnajā barotnē augušās vai oglekļa badinātās šūnas (8A. attēls). To var daļēji izskaidrot ar glikozes transporteru zudumu. Slāpekļa badinātās šūnas fermentējama oglekļa avota (piemēram, glikozes) klātbūtnē zaudē glikozes transporterus, kas nenotiek oglekļa badināšanas laikā (Nilsson et al., 2001). Transporteru trūkums paildzina lag fāzes (Cerulus et al., 2018).

Aplūkojot pielāgošanās laiku celmiem glikozē un galaktozē, visiem purīnu auktrotrofiem novērojama mazāka lag fāžu attiecība, ja šūnu kultūra iepriekš tikusi badināta (8C. attēls). Prototrofam nav novērojama statistiski būtiskas atšķirības ($p < 0,05$) starp iepriekš SD+ vai *ade-* augušām šūnām. To var izskaidrot ar prototrofa spēju pašam sintezēt savus purīnus. Līdz ar to, prototrofu neietekmē adenīna pieejamība vai nepieejamība.

Iepriekš laboratorijā iegūtie skābekļa patēriņa dati (Ozoliņa, npublicēti, 2022) norāda uz šūnas elpošanas izmaiņām atsevišķiem purīnu biosintēzes mutantiem. Izmaiņas šūnas elpošanā var ietekmēt *S. cerevisiae* spējas augt uz oksidatīvajiem oglekļa avotiem, piemēram, citronskābes, acetāta, etanola vai glicerīna. Lai to noskaidrotu, veicām purīnu biosintēzes mutantu audzēšanu 96 lauciņu mikroplatē ar dažādiem oglekļa avotiem (9. attēls; 4. pielikums).

Iegūtie rezultāti YP barotnē (9. attēls) rāda, ka raugu augšana notiek gan glikozes klātbūtnē, gan YP barotnē bez papildus pievienota oglekļa avota. Atsevišķiem purīnu *de novo* sintēzes mutantiem – *ade1* un *ade16ade17* – augšanu inhibē acetāta pievienošana, kas nav novērojama citiem mutantiem. Šūnu kultūras audzētas YP barotnē, kurā pieejams adenīns, tāpēc iegūtie rezultāti nav saistīti ar tiešu purīnu auktrotrofiju (augšana nenotiek, ja barotnē nav adenīna), bet gan ar kādu citu fizioloģisko funkciju, kurā iesaistīti purīnu biosintēzes ceļa gēni. Šie dati norāda, ka, iespējams, purīnu biosintēzes ceļa beigu daļas mutantiem – *ade1* un *ade16ade17* – ir izmainīta elpošana.

Eksperimentu atkārtojot sintētiskajā barotnē (SD) barotnē, augšanu uz acetāta nenovēro nevienam no darbā izmantotajiem celmiem (4. pielikums). Šis varētu norādīt uz to, ka YP barotnē ir pieejamas barības vielas, kuras nepieciešamas augšanai uz oksidatīvajiem substrātiem, bet nav atrodamas SD barotnē (1. pielikums).

Galardini un kolēģi (2019) novērojuši, ka, audzējot purīnu biosintēzes ceļa mutantu kolonijas barotnē ar acetātu, tie aug ātrāk nekā izejas celms. Purīnu biosintēzes ceļa beigu daļas mutanti *ade1* un *ade2* auguši līdz pat 3 reizēm ātrāk kā prototrofs, tāpat novērota augšanas inhibīcija visiem purīnu sintēzes ceļa mutantiem glicerīna klātbūtnē (Galardini et al., 2017). Šajā darbā oksidatīvo substrātu kultivācijas veiktas 96 lauciņu platēs, kurās iespējami skābekļa piekļuves traucējumi. Šo eksperimentu būtu ieteicams atkārtoti veikt arī uz agara platēm, vērojot koloniju augšanas dinamiku. Tāpat eksperimentu būtu ieteicams atkārtot, veicot garākas kultivācijas, lai varētu aprēķināt dažādos substrātos sasniegtos specifiskos augšanas ātrumus un OD_{max} .

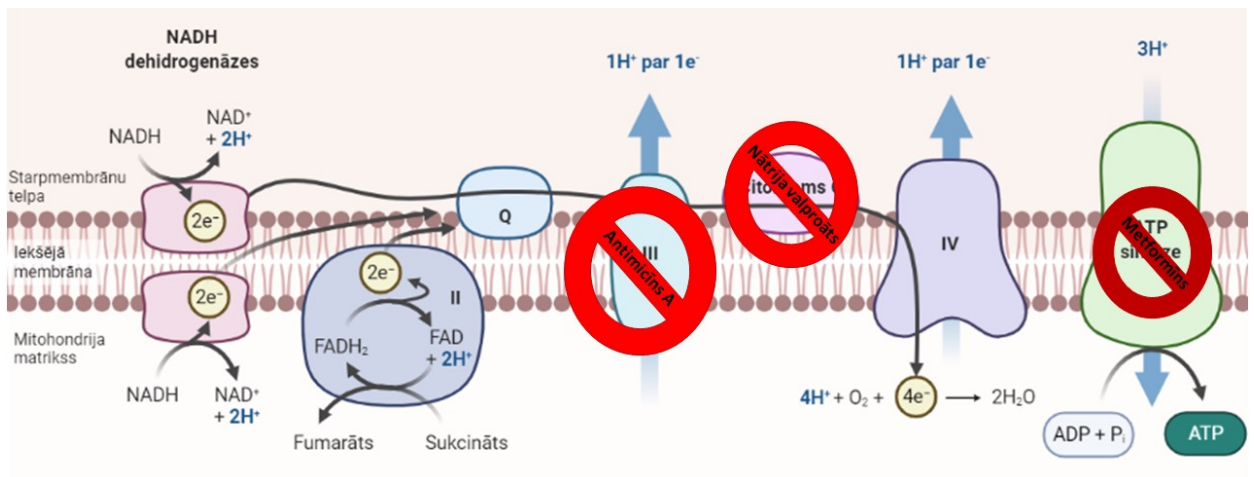
4.2. Nātrija valproāta un metformīna radītie efekti

Šī darba ietvaros iegūti dati par *S. cerevisiae* purīnu auksotrofu augšanu mitohondrionālo inhibitoru klātbūtnē šķidrā barotnē (10. attēls; 5. pielikums), kā arī uz agara platēm (11. attēls; 6. pielikums).

S. cerevisiae var kultivēt fermentieros, kolbās vai mikroplatēs. Dažādie kultivācijas veidi atšķiras arī pēc skābekļa piekļuves šūnu kultūrai. Mikroplatēs ir traucēta skābekļa piekļuve šūnām (Guardino et al., 2004). Darbā izmantotajās 384 lauciņu mikroplatēs skābekļa piekļuve ir apgrūtināta to bedrīšu mazā izmēra dēļ (Guardino et al., 2004). Bez inhibitora klātbūtnes auksotrofiem novērotie specifiskie augšanas ātrumi bija lielāki nekā prototrofam (10. attēls), ko var izskaidrot ar purīnu auksotrofu labāku pielāgotību apstākļiem ar zemāku skābekļa saturu.

Nātrija valproāta klātbūtnē šķidrās kultivācijās ir novērojamas garākas lag fāzes, mazāki specifiskie augšanas ātrumi un arī mazāki sasniegtie OD_{max} (10. attēls). Koloniju audzēšanas eksperimentos nātrija valproāta klātbūtnē novērojami ļoti lieli detekcijas laiki, kā arī niecīgi kolonijas augšanas ātrumi (11. attēls). Nātrija valproāts inhibē citohroma C oksidāzi mitohondrija elektronu transporta ķēdē (Salsaa et al., 2020). *S. cerevisiae* dod priekšroku fermentācijai gan anaerobajos apstākļos, gan tad, kad skābeklis ir daudz un brīvi pieejams (Rintala et al., 2009). Kolonijas audzētas apstākļos, kurās skābekļa piekļuve nav traucēta (Petri plates vāciņš ir noņemts), kas vedina pieņemt, ka raugs fermentē. Šo procesu vēl vairāk aktivē nātrija valproāts, kura klātbūtnē notiek aktīvāka etanola ražošana un tiek inhibēts skābekļa patēriņš (Salsaa et al., 2020).

Ir publicēti dati, ka samazināta skābekļa koncentrācijas (bet ne anaerobā) vide stimulē Krebsa cikla enzīmu aktivitāti (Rintala et al., 2009). Mikroplašu kultivācijās ir traucēta skābekļa piekļuve (Guardino et al., 2004), kas attiecīgi varētu palielināt Krebsa cikla enzīmu aktivitāti (Rintala et al., 2009). Līdz ar to var spekulēt, ka uz agara platēm nātrija valproāta klātbūtnē augošās šūnas vairāk fermentē nekā tās, kuras kultivētas mikroplatēs. Šūnām fermentējot ir lielāki dalīšanās laiki – tās aug lēnāk, kas varētu izskaidrot relatīvi lielos koloniju detekcijas laikus un mazos koloniju augšanas ātrumus (11. attēls). Atsevišķiem mutantiem – *ade57* un *ade8* – detekcijas laiki bija tik lieli, ka nebija iespējams aprēķināt rādīša augšanas ātrumu, turklāt šo mutantu N- un ade- badinātās šūnu kultūras 72h laikā nebija detektējamas (11B. attēls). Valproāta klātbūtnē palielina glikolīzes starpproduktu ražošanu, palielina glikolītisko gēnu ekspresiju un etanola ražošanu (Salsaa et al., 2020).



13 .attēls. Maizes rauga *S. cerevisiae* mitohondrionālā elektronu transporta ķēde. Ar sarkanajām zīmēm norādīti inhibitoru inhibētie kompleksi. Metformīns samazina ATP sintāzes transkripciju, bet neinhibē to. Autora attēls. Attēls izveidots biorender.com.

Figure 13. Baker's yeast *S. cerevisiae* mitochondrial electron transport chain. Red signs denote inhibited complexes. Metformin decreases transcription of ATP synthase but does not inhibit it. Author's figure. Figure created in biorender.com.

Gan nātrija valproāts, gan antimicīns A ir elektronu transporta ķēdes inhibitori un aptur tajā notiekošo elektronu plūsmu. Sagaidāms, ka to radītie augšanas fenotipiskie efekti būtu tādi paši, bet tas netika novērots (10. attēls). To iespējams izskaidrot ar nātrija valproāta radītajiem blakus efektiem. Ir zināms, ka, piemēram, *Schizosaccharomyces pombe* nātrija valproāts ietekmē membrānu transportu un šūnapvalka stabilitāti (Miyatake et al., 2007), un, visticamāk, *Saccharomyces* tas ietekmē līdzīgi.

ade4 mutantam nātrija valproāta klātbūtnē novērojamas augšanas izmaiņas (10. attēls). Slāpekļa badinātās *ade4* šūnas uzrādījušas ievērojami ($p < 0,05$) zemāku OD_{max} , kā arī specifisko augšanas ātrumu. Augšanas īpatnību dēļ *ade4* *ade-* nevarēja noteikt lag fāzes ilgumu. Iespējams, ka šīs *ade4* mutantu augšanas īpatnības iespējams izskaidrot ar nātrija valproāta radītajiem blakus efektiem, kas nav saistīti ar elektronu transporta ķēdi un ir izteiktāki *ade4* mutantam. Iespējams, tieši *ade4* mutantam, pateicoties enerģijas taupīšanas hipotēzei, varētu būt raksturīgi no citiem adenīna auktrotrofiem atšķirīgi pielāgojumi. Purīnu sintēzes ceļa daļa līdz IMP sazarojumam patērē četras ATP molekulas un, iztrūkstot kādam gēnam ceļa vidū vai beigās, visticamāk, tiek veikti visi soļi līdz tam, patērējot enerģiju. *ADE4* ir purīnu sintēzes ceļa pirmo soli kodējošs gēns, un bez tā sintēze nevar tikt uzsākta.

Lai pilnībā varētu novērtēt *ade4* augšanas fenotipu, būtu ieteicams papildināt iztrūkstošos koloniju kultivācijas datus (11. attēls). Šobrīd nav veiktas koloniju kultivācijas antimicīna A klātbūtnē, kā arī *ade16ade17*, *ade4* un *ade1* (C- un N-) kultivācijas pārējo inhibitoru klātbūtnē.

Oglekļa (C) limitācija fenotipiski ir līdzīga 100mM metformīna radītajam fenotipam – līdzīgi specifiskie augšanas ātrumi, lag fāžu ilgumi un izdzīvotība, tomēr atšķiras ar izmantotajiem signālceļiem un notiekošajiem iekššūnu metaboliskajiem procesiem (Borklu-Yucel et al., 2015). C limitācija palielina aerobo elpošanu, bet metformīna klātbūtne – veicina glikozes uzņemšanu, samazina glikozes iekššūnas koncentrāciju un pastiprina fermentāciju (Borklu-Yucel et al., 2015). Metformīns supresē glikozes 6-fosfatāzes ekspresiju (Ota et al., 2009). C limitācija veicina (angl. - *upregulates*) aerobisko elpošanu, Krebsa ceļu, elektronu transporta ķēdi, glikozes transportu un glikogēna regulatoros procesus (Borklu-Yucel et al., 2015).

Šis vedina domāt, ka C badinātajām šūnām ir nepieciešams ilgāks laiks, lai pielāgotos oglekļa patēriņam metformīna klātbūtnē, tomēr tas neparādās datos, tikai *ade4* un *ade1* C-šūnām metformīnā ir garākas lag fāzes kā citām šūnām (10. attēls). Galaktozē N- badinātajām *ade4*, *ade8*, *ade6* un *ade2* šūnām bija novērojami mazāki OD_{max} , bet augšanas īpatnību dēļ tiem galvenokārt nevarēja aprēķināt lag fāžu ilgumus vai specifiskos augšanas ātrumus. Tāpat koloniju kultivācijās ar metformīnu detekcijas laiki kļuva lielāki visiem darbā izmantotajiem celmiem, tomēr *ade2* un *ade6* rādiusa augšanas ātrums bija mazāki kā pārējiem celmiem (11. attēls). Šiem celmiem rādiusa izmaiņas ātrumi ir lielāki nekā barotnē bez inhibitora.

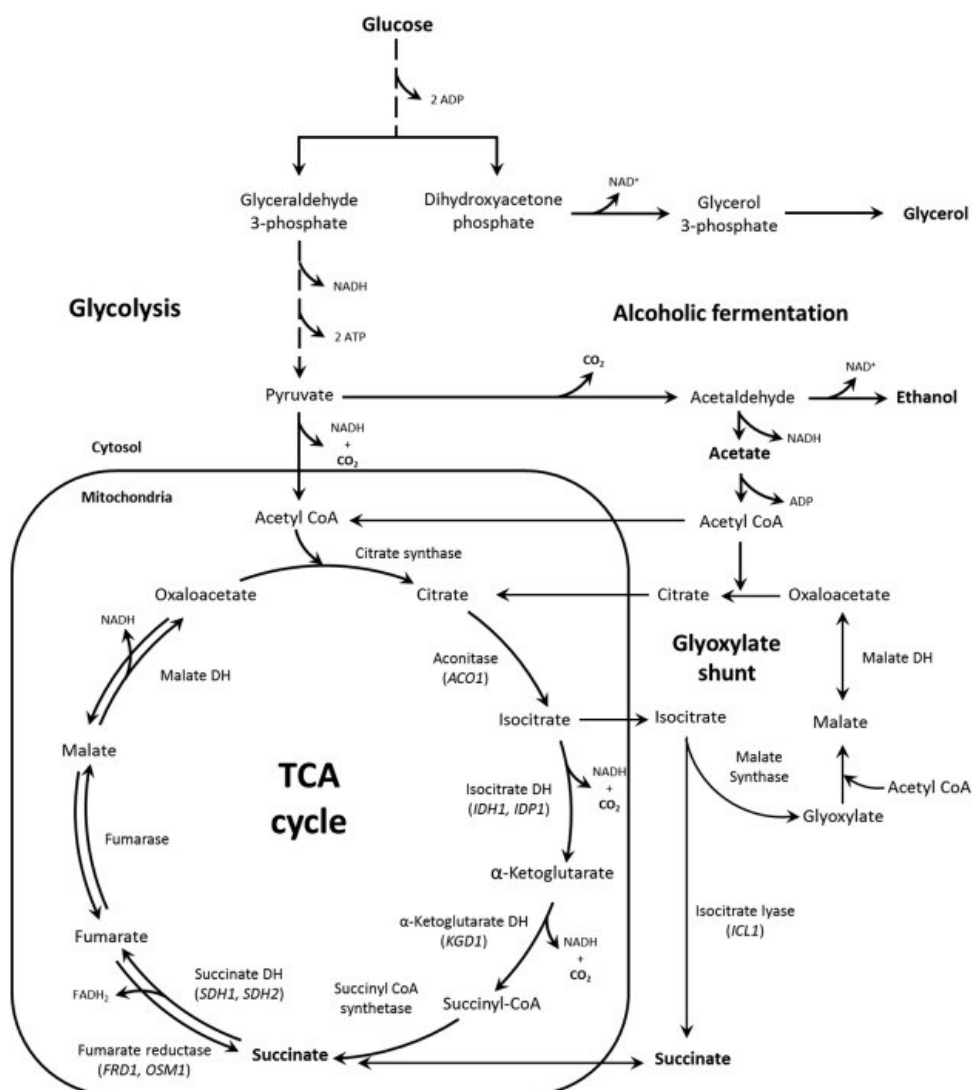
4.3. *ade6/2* mutācijas palielina *S. cerevisiae* pielāgotību O_2 limita apstākļos

Laboratorijā novērots, ka *ade2* un *ade6* mutanti skābekļa bagātos apstākļos fermentieros (Auziņš, bakalaura darbs, 2021) vai uz agara platēm (11. attēls) aug līdzīgi kā prototrofs. Šī darba ietvaros, kultivējot 384 lauciņu mikroplatēs bez inhibitora klātbūtnes, novērots pretējais. *ade2* mutanti aug būtiski ($p < 0,05$) ātrāk nekā prototrofs (10. attēls). Šo atšķirību varētu izskaidrot *ade2* un *ade6* mutantu mazākām prasībām pēc skābekļa.

Antimicīns A inhibē elektronu transporta ķēdes III kompleksu (Boumans et al., 1998). *S. cerevisiae* ir *crabtree* pozitīvs raugs, un glikozes klātbūtnē izvēlas fermentēt, nevis to oksidēt (Hagman et al., 2013). Līdz ar to būtu sagaidāms, ka antimicīns A neietekmē fermentējošos raugus. Tomēr lielākajai daļai purīnu auksotrofu tā klātbūtnē bija novērojamas garākas lag fāzes un mazāki augšanas laiki (10. attēls).

Tāpat *ade2* un *ade6* mutantiem barotnē bez inhibitora ir novērojamas īsākas lag fāzes un lielāki specifiskie augšanas ātrumi šķidrās barotnes kultivācijās nekā prototrofam. Līdzīgi novērojumi saglabājas arī antimicīna A klātbūtnē, kā arī tiem ir īsākas lag fāzes nekā prototrofam (10. attēls). Antimicīna A klātbūtnē barotnē ar galaktozi bija novērojama augšana *prot*, *ade2* un *ade6*, bet ne citiem purīnu auktrotrofiem (5. pielikums).

Arī nātrija valproāta klātbūtnē *ade2* un *ade6* ir novērojami lielāki specifiskie augšanas ātrumi (10. attēls). Nātrija valproāts inhibē citohromu C, kas saista III un IV kompleksu, un tā klātbūtnē *S. cerevisiae* samazina skābekļa patēriņu (Salsaa et al., 2020). Abi inhibitori aptur elektronu transporta ķēdi, neļaujot nonākt līdz elektronu akceptoram. Iespējams, ka šiem abiem celmiem (*ade2* un *ade6*) ir pielāgojumi, kas ļauj uzturēt augstu augšanas ātrumu, neizmantojot Krebsa ciklu un elektronu transporta ķēdi. Alternatīva Krebsa ciklam ir glioksilāta cikls (14. attēls), kurā var iegūt daļu no augšanai nepieciešamajiem metabolītiem, piemēram, oksalacetātu un vienu NADH molekulu (Raab et al., 2011; Nelson et al., 2001).



14. attēls. Krebsa cikls un glioksilāta cikls *S. cerevisiae*. Attēls no Rezaei et al., 2015.

Figure 14. TCA cycle and glyoxylate cycle in *S. cerevisiae*. Figure from Rezaei et al., 2015.

Šī darba ietvaros iegūti dati par *S. cerevisiae* purīnu auksotrofijas mutantu Krebsa enzīmu aktivitāti. Nevienam no pārbaudītajiem enzīmiem – izocitrāta, α -ketoglutarāta un malāta dehidrogenāzes (DH) – nav novērojamas aktivitātes atšķirības starp prototrofu un *ade4* mutantu (12. attēls).

S. cerevisiae ir trīs dažādi izozīmi izocitrāta dehidrogenāzei. Mitohondrija matriksā ir NAD-atkarīgā un NADP-atkarīgā izocitrāta dehidrogenāze (gēns *IDP1*), bet citosolā otra - NADP-atkarīgā izocitrāta dehidrogenāze (kodē gēns *IDP2*) (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993). Diviem no šiem izozīmiem ir nepieciešams cits kofaktors, tāpēc izozīmu esamība neietekmē darbā veiktos mērījumus.

Izocitrāta DH aktivitāte lielākoties ir nemainīga visiem purīnu auksotrofiem, bet tā ir būtiski samazināta ($p < 0,05$) celmiem ar mutācijām biosintēzes ceļa beigu daļā (12A. attēls). Tas varētu norādīt uz izmainītu elpošanu šiem celmiem. *Ade16ade17* ir atbildīgs par IMP sintēzi purīnu biosintēzes ceļā. IMP atrodas purīnu *de novo* un *salvage* ceļa krustpunktā (3. attēls). Tāpat *ade16ade17* novērota ievērojami samazināta visu mērīto Krebsa cikla enzīmu aktivitāte. Šis novērojams sakrīt gan ar citiem laboratorijas eksperimentiem, gan literatūru. Laboratorijā esam novērojuši, ka *ade16ade17* mutantam ir *petite* mutantiem raksturīgas pazīmes – mazs augšanas ātrums, mazas kolonijas, negatīva reakcija ar mitohondriju aktivitāti raksturojošu krāsvielu (Mehaņikova, npublicēts, 2022). Vowinckel un kolēģi (2021) novērojuši, ka *petite* mutantiem ir samazināts α -ketoglutarāta daudzums šūnās. Lai iegūtu vairāk informācijas par oglekļa metabolisma izmaiņām *ade16ade17* mutantā, būtu jāpapildina šajā darbā iegūtie dati ar šī celma kultivācijām inhibitoru klātbūtnē gan šķīdrajā barotnē, gan uz agara platēm.

Lai gan *S. cerevisiae* ir vairāki enzīmi, kuri patērē α -ketoglutarātu (GLT1, GDH3 un GDH1 komplekss), to aktivitātei nevajadzētu ietekmēt šajā darbā iegūto mērījumu rezultātus. α -ketoglutarāta DH aktivitātes mērījumi veikti pievienojot kofaktorus NAD⁺ un koenzīmu A. GDH3 un GDH1 kompleksa katalizētajai reakcijai kā kofaktors ir nepieciešams NADPH, kā arī NH₄, savukārt GLT1 katalizētajai reakcijai NADH un glutamīns (Mara et al., 2018).

Mutantiem *ade6* un *ade2* ir novērojama zema α -ketoglutarāta DH aktivitāte, bet augstas izocitrāta un malāta DH aktivitātes. To var izskaidrot ar glioksilāta cikla palielinātu darbību šajos purīnu biosintēzes ceļa mutantos (14. attēls). Glioksilāta cikls norit citoplazmā. Izocitrāts piedalās gan trikarbonskābju ciklā, gan glioksilāta ciklā. Izocitrāta liāze ir glioksilāta cikla enzīms, kas izocitrātu šķeļ par sukcinātu un glioksilātu (YeastPathways, 2022).

Izocitrāta DH augsto aktivitāti *ade6* un *ade2* var izskaidrot ar nepieciešamību pēc α -ketoglutarāta. Tas ir savienojums, kuru ne tikai oksidē Krebsa ciklā, bet arī plaši izmanto glutamāta sintēzē (Zhang et al., 2020). *S. cerevisiae* ir vairāki enzīmi, kas no α -ketoglutarāta veido glutamātu, piemēram, Glt1, Gdh3 un Gdh1 komplekss (YeastPathways, 2022; Mara et al., 2018). Glutamāts ir viens no galvenajiem savienojumiem slāpekļa metabolismā.

α -ketoglutarāta DH ir enzīms, kurš nepiedalās glioksilāta ciklā, tāpēc tā aktivitāte ir maza, un tā *ade6* un *ade2* mutantiem nav nepieciešama, ja tajos galvenokārt norisinās glioksilāta cikls. *ade6* purīnu biosintēzes ceļā katalizē slāpekļa pievienošanos no glutamīna (15. attēls).

S. cerevisiae ir vairāki malāta dehidrogenāžu izozīmi. Malāta dehidrogenāze, kuru kodē *MDH1* gēns, ir Krebsa cikla enzīms, kas atrodas mitohondrija matriksā (Thompson et al., 1988), malāta dehidrogenāze Mdh2 – citoplazmā esošs proteīns, kas piedalās glioksilāta ciklā (Minard & McAlister-Henn, 1991). Savukārt Mdh3 atrodas glioksisomās un piedalās taukskābju beta oksidācijā (Moriyama et al., 2018). Visas šīs dehidrogenāzes veic vienu reakciju: **malāts + NAD⁺ → oksālacetāts + NADH**. Enzīmu aktivitātes mērījumi veikti permabilizētās šūnās līdz ar to mērīta visu dehidrogenāžu kopējā reaģētspēja.

Lielo aktivitāti *ade6* un *ade2* mutantiem (12. attēls; 7. pielikums) var izskaidrot arī ar lielāku citoplazmātiskās malāta DH aktivitāti, nevis Mdh1, kura atrodas mitohondrija matriksā un piedalās Krebsa ciklā. Ar darbā izmantoto metodi nav iespējams nošķirt, kura tieši enzīma aktivitāte tiek nomērīta. Lai iegūtu konkrēti mitohondriālās malāta dehidrogenāzes aktivitāti, to var mērīt nevis permabilizētās šūnās, bet gan izolētos mitohondrijos. Vēl par Mdh1 aktivitāti varētu spriest to nomērot permabilizētiem *petite* mutantiem un atņemot *petite* malāta DH aktivitāti no šajā darbā iegūtās.

Izmainītā enzīmu aktivitāte un uzlabotā augšana elektronu transporta ķēdes inhibitora antimicīna A klātbūtnē rada aizdomas, ka *ade2* un *ade6* pat glikozes klātbūtnē izvēlas glioksilāta ciklu. Glioksilāta cikls nodrošina glikozes neoģenēzi no beta oksidācijā sašķeltajām taukskābēm (Raab et al., 2011). Tāpat glioksilāta cikls ir iesaistīts fermentatīvā substrāta – acetāta – izmantošanā (Lee et al., 2011). YP barotnē ar acetātu (10. attēls) novērota *ade6* augšana, bet tā nav novērojama *ade2* mutantam. Lai pilnībā novērtētu izmaiņas *ade2* un *ade6* mutantu oglekļa metabolismā, ir nepieciešams iegūt vēl papildus datus, piemēram, vai glikozes klātbūtnē rodas papildus sukcināts (14. attēls), kur tas tiek tālāk tērēts, kāda ir pārējo Krebsa enzīmu aktivitāte purīnu biosintēzes mutantiem?

Iespējams, ka sukcināts tiek transportēts atpakaļ mitohondrijā, lai sukcināta dehidrogenāze to pārvērstu par fumarātu (14. attēls). Pēc sintēzes mitohondrijā fumarāts var tikt patērēts tālāk esošajās Krebsa cikla reakcijās vai transportēts atpakaļ uz citoplazmu. Sukcināta-fumarāta transportu pāri mitohondrionālajām membrānām nodrošina antiporters Sfc1, tāpat sukcinātu mitohondrijā spēj transportēt Dic1 transporteris, kas vienlaicīgi citosolā nogādā vienu fosfāta grupu (Palmieri et al., 2006). Purīnu biosintēzes ceļā, sintezējot adenīnu, tiek saražotas divas fumarāta molekulas, bet guanīna gadījumā – viena (YeastPathways, 2022) (15. attēls). Iespējams, ka arī fumarāts ir iesaistīts purīnu auktrotrofu veidojošajā respiratorajā fenotipā. Lai šo noskaidrotu, ir nepieciešami tālāki pētījumi, piemēram, sukcināta un fumarāta plūsmas mērījumi, kā arī pārējo Krebsa cikla enzīmu aktivitātes mērījumi.

4.4. Purīnu biosintēzes ceļa saistība ar mitohondrija metabolismu

Purīnu biosintēze ir enerģētiski dārgs process, kuram nepieciešamas dažādas izejvielas. Daļa no šīm izejvielām tiek vai nu sintezēta vai nu arī patērēta mitohondrija bioķīmiskajos procesos (15. attēls). Izpētot šo metabolītu plūsmas, iespējams, var izziņāt, kā tieši purīnu auktrotrofija ietekmē mitohondrionālo metabolismu.

Viens no bioķīmiskajiem procesiem, kas saista mitohondriju ar purīnu *de novo* sintēzes ceļu, ir folātu cikls (6. attēls). Folāta cikls ražo formil-THF, kas nepieciešams purīnu biosintēzes ceļa trešajam un devītajam solim, kuru katalizē respektīvi Ade8 un Ade16ade17. Tāpat folāta ciklā gan citoplazmā, gan mitohondrijā tiek ražots glicīns (6. attēls) – aminoskābe, kas tiek patērēta purīnu *de novo* ceļa otrajā solī (Jones et al., 1982; Matecic et al., 2010). Glicīnu pāri mitohondrionālajai membrānai var pārvietot ar Hem25 transporteri (Ferramosca & Zara, 2021). Viens no folāta cikla inhibitoriem ir metatreksāts.

Iepriekš novērots, ka darbā izmantotā metatreksāta koncentrācija 1 mM 24 h laikā veido citoplazmiskos *petite* mutantus, kas pārsniedz vairāk nekā 50% no šūnu populācijas (Wintersberger et al., 1973). Iespējams, ka inhibēto augšanu daļēji var izskaidrot ar *petite* mutantu parādīšanos populācijā. *Petite* mutantiem ir raksturīga daudz garāka lag fāze un mazāks specifiskais augšanas ātrums minimālajā sintētiskajā barotnē (Vowinckel et al., 2021).

Metatreksāta klātbūtnē tiek bloķēta dihidrofolāta reduktāze (Dfr1), kas šūnā izraisa adenīna, histidīna, metionīna un dezoksitimidīna monofosfāta (dTMP) auktrofiju, kas ir novērojama arī šī paša gēna *null* mutantiem. Iespējams, ka inhibēto augšanu, kas novērota gan šķidrajā barotnē (10. attēls), gan uz koloniju kultivācijās (11.attēls) ir izraisījusi histidīna, metionīna un dTMP neesamība barotnē. Mikroplašu lasītājā celmi audzēti pilnajā sintētiskajā barotnē ar pievienotu adenīnu ar/bez metatreksāta. Lai pilnvērtīgi novērtētu purīnu biosintēzes ceļa mutāciju ietekmi uz metatreksāta inhibīciju, būtu nepieciešams tos audzēt barotnē, kas nodrošina visas, ne tikai adenīna auktrofijas prasības.

Atšķirībā no metatreksāta inhibīcijas, *Δdfr1 knock-out* mutantu augšanas prasības neapmierina papildus pieejama folskābe (Huang et al., 1992). Vērtīgi būtu noskaidrot, vai purīnu auktrofijai ir no prototrofa atšķirīgs fenotips, ja barotnē tiek pievienota lielāka folskābes koncentrācija. Šajā gadījumā fenotipu atšķirības norādītu uz purīnu biosintēzes ceļa saistību ar mitohondriju caur folāta cikla metabolītiem un Dfr1 esamību vai neesamību.

Nākotnē būtu interesanti ieskatīties arī alternatīvos metaboliskajos ceļos, kas saista purīnu biosintēzi un mitohondriālā metabolismu, vai, ja tie tiek inhibēti vai "izslēgti", ir novērojami atšķirīgi fenotipi starp prototrofu un purīnu auktrofijai. Purīnu sintēze patērē dažādus metabolītus, kas piedalās arī virknē citu bioķīmisko ceļu šūnā.

Purīnu biosintēzes pirmais un ceturtais solis patērē glutamīnu (Gln). Tā ir aminoskābe, kas kalpo par vienu no galvenajiem aminogrupas donoriem šūnā. Citosolā to no glutamīnskābes sintezē Gln1. Glutamīnskābi šūnā sintezē vairāki enzīmi: citosolā esošais Gdh1 un Gdh3 komplekss, kā arī mitohondrijā esošie Glt1 un Gdh3. Glutamīnskābe var arī tikt transportēta no citoplazmas uz mitohondriju caur aspartāta-glutamīnskābes antiportu Agc1 (Palmieri et al., 2006). Visi trīs šie enzīmi sintēzei patērē α -ketoglutarātu – savienojumu, kas tiek sintezēts Krebsa ciklā (4. attēls) (YeastPathways, 2022). α -ketoglutarāts no mitohondrija matricas citoplazmā var nokļūt caur Odc1-2 (malāta un α -ketoglutamāta antiportu) (Palmieri et al., 2006). Iespējams, ka purīnu auktrofijas izraisītās izmaiņas glutamīna un α -ketoglutarāta apritē ietekmē aerobo metabolismu. Lai par to pārliecinātos, būtu nepieciešams noskaidrot α -ketoglutarāta plūsmas prototrofam un adenīna auktrofijai.

5. SECINĀJUMI

Mutācijas purīnu *de novo* sintēzes ceļā ietekmē mitohondrionālo metabolismu.

Adenīna sintēzes ceļa mutantajiem celmiem pielāgošanās laiks (lag fāzes ilgums) jaunam fermentatīvajam substrātam ir atkarīgs no šūnu kultūras pirmsapstrādes, bet ne no mutācijas vietas.

Bez oglekļa, slāpekļa vai adenīna badinātiem adenīna auktrotrofiem celmiem raksturīga augstāka pielāgotība nekā, ja tie kultivēti pilnajā barotnē.

Adenīna auktrotrofiem atsevišķos apstākļos raksturīga labāka spēja pielāgoties nekā prototrofam.

ade2 un *ade6* mutanti glikozi katabolizē caur glioksilātu ciklu.

ade16ade17 mutantam novērojamas *petite* celmiem raksturīgas pazīmes.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājiem Zanei Ozoliņai un Jānim Liepiņam par ieguldīto laiku, darbu un diskusijām, kā arī ieteikumiem darba veikšanā.

Darbs izstrādāts Latvijas Zinātnes Padomes finansētā projekta “No purīnu badošanās līdz stresu noturīgam fenotipam - atklājot mehānismus” (LZP-2021/1-0522) ietvaros. Pateicos Latvijas Zinātnes Padomei par finansiālo atbalstu.

Pētījums ieguvis finansiālu atbalstu Eiropas Reģionālās attīstības fonda projekta “Latvijas Universitātes inovāciju granti studentiem” (1.1.1.3/18/A/007) ietvaros. Pateicos Eiropas Reģionālās attīstības fondam par finansiālo atbalstu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- Agmon, N., Temple, J., Tang, Z., Schraink, T., Baron, M., Chen, J., Mita, P., Martin, J.A., Tu, B.P., Yanai, I. and Fenyö, D., 2020. Phylogenetic debugging of a complete human biosynthetic pathway transplanted into yeast. *Nucleic acids research*, 48(1), pp.486-499.
- Alsuhaim H., Vojisavljevic V., Pirogova E. 2013. Effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. - In World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering May 26-31, 2012, Beijing, China. 48-51. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Andreichuk Yu. V., Domkin V. D., Ryzhova T. A., Koulikov V. N., Kostikova T. R. 1997. ADE6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* yeast encoding formylglycinamidine-ribonucleotide synthetase. Cloning, sequencing, and analysis. – *Biochemistry (Moscow)*, 62(7): 742-752.
- Auziņš E. 2021. Adenīna biosintēzes ceļa mutāciju ietekme uz maizes rauga centrālo oglekļa metabolismu slāpekļa un purīnu badināšanas laikā. Bakalaura darbs. Rīga, Latvijas Universitāte.
- Baek H. W., Kim S. A., Min W. K., Dal Kang S., Shim S., Han N. S., Seo J. H. 2020. A Species-Specific qPCR Method for Enumeration of *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis*, and *Lactobacillus curvatus* During Cocultivation in Sourdough. - *Food Analytical Methods*: 1-11.
- Bär, J., Boumasmoud, M., Kouyos, R. D., Zinkernagel, A. S., & Vulin, C. 2020. Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
- Baryshnikova A., Costanzo M., Kim Y., Ding H., Koh J., Toufighi K., Youn J. Y., Ou J., San Luis B. J., Bandyopadhyay S., Hibbs M., Hess D., Gingras A. C., Bader G. D., Troyanskaya O. G., Brown G.W., Andrews B., Boone C., Myers C. L.. 2010. Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. - *Nature Methods*. 7(12):1017-24.
- Borklu-Yucel, E., Eraslan, S., & Ulgen, K. O. 2015. Transcriptional remodeling in response to transfer upon carbon-limited or metformin-supplemented media in *S. cerevisiae* and its effect on chronological life span. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6775–6789.
- Boumans, H., Grivell, L. A., & Berden, J. A. 1998. The Respiratory Chain in Yeast Behaves as a Single Functional Unit. *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 4872–4877.

- Campbell N., Cain M., Minorsky P., Reece J., Urry L., Wasserman S., 2018. Biology. 11th ed. 284-341.
- Cerulus B., New A.M., Pougach K., Verstrepen K.J. 2016. Noise and epigenetic inheritance of single-cell division times influence population fitness. - *Current Biology*, 26(9), pp.1138-1147.
- Cerulus, B., Jariani, A., Perez-Samper, G., Vermeersch, L., Pietsch, J. M., Crane, M. M., ... & Verstrepen, K. J. 2018. Transition between fermentation and respiration determines history-dependent behavior in fluctuating carbon sources. *Elife*, 7, e39234.
- Chandler, C. H., Chari, S., & Dworkin, I. 2013. Does your gene need a background check? How genetic background impacts the analysis of mutations, genes, and evolution. *Trends in genetics*, 29(6), 358-366.
- Christensen, K. E., & MacKenzie, R. E. 2006. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *Bioessays*, 28(6), 595-605.
- Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Mitochondria.
- Cooper, C. E., Nicholls, P., & Freedman, J. A. 1991. Cytochrome c oxidase: structure, function, and membrane topology of the polypeptide subunits. *Biochemistry and Cell Biology*, 69(9), 586–607.
- Crofts, A. R. 2004. The Cytochrome bc1 Complex: Function in the Context of Structure. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 689–733.
- Daignan-Fornier B., Fink G.R. 1992. Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and PHO2. – *Genetics*, 39 (15): 6746-6750.
- Day, M. 2013. Yeast Petites and Small Colony Variants. *Advances in Applied Microbiology*, 1–41.
- De Deken R. H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. - *Microbiology*, 44(2): 149-156.
- DeRisi J. L., Iyer V. R., Brown P. O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. - *Science*, 278(5338): 680-686.
- Dykhuizen, D. 1978. Selection for tryptophan auxotrophs of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats as a test of the energy conservation hypothesis of evolution. *Evolution*, 125-150.
- Dorfman B. Z. 1969. The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. – *Genetics*, 61(2): 377-389.

- Douillet, D. C., Pinson, B., Ceschin, J., Hürlimann, H. C., Saint-Marc, C., Laporte, D., ... & Daignan-Fornier, B. 2019. Metabolomics and proteomics identify the toxic form and the associated cellular binding targets of the anti-proliferative drug AICAR. *Journal of Biological Chemistry*, 294(3), 805-815.
- El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., & Leverve, X. 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 223-228.
- Engel S. R., Dietrich F. S., Fisk D. G., Binkley G., Balakrishnan R. et al., Cherry J. M. 2013. The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. – *G3 (Bethesda)*, 4(3): 389-398.
- Espagnon I., Ostrovskii D., Mathey R., Dupoy M. G., Joly P., Novelli-Rousseau A., Pinston F., Gal O., Mallard F., Leroux D. F. 2014. Direct identification of clinically relevant bacterial and yeast microcolonies and macrocolonies on solid culture media by Raman spectroscopy. – *Biomed Opt.* 19(2) 027004.
- Espinosa-Cantú, A., Ascencio, D., Barona-Gómez, F., & DeLuna, A. 2015. Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins. *Frontiers in genetics*, 6, 227.
- Ferramosca, A., & Zara, V. 2021. Mitochondrial Carriers and Substrates Transport Network: A Lesson from *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8496.
- Fontaine, E. 2018. Metformin-induced mitochondrial complex I inhibition: facts, uncertainties, and consequences. *Frontiers in endocrinology*, 753.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., & Purnelle, B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 440(3), 325–331.
- Galardini M., Busby B. P., Vieitez C., Dunham A. S., Typas A., Beltrao P. 2019. The impact of the genetic background on gene deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. - *Molecular systems biology*, 15(12): e8831.
- Geier, B. M., Schägger, H., Ortwein, C., Link, T. A., Hagen, W. R., Brandt, U., & Von Jagow, G. 1995. Kinetic properties and ligand binding of the eleven-subunit cytochrome-c oxidase from *Saccharomyces cerevisiae* isolated with a novel large-scale purification method. *European journal of biochemistry*, 227(1-2), 296–302.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., ... & Johnston, M. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387-391.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Oliver, S. G. et al., 1996. Life with 6000 Genes. - *Science*, 274(5287): 546–567.

- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial Evolution . 1999; Science. 283:1476–81
- Guarino, R. D., Dike, L. E., Haq, T. A., Rowley, J. A., Pitner, J. B., & Timmins, M. R. 2004. Method for determining oxygen consumption rates of static cultures from microplate measurements of pericellular dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and bioengineering*, 86(7), 775-787.
- Guarino, R. D., Dike, L. E., Haq, T. A., Rowley, J. A., Pitner, J. B., & Timmins, M. R. 2004. Method for determining oxygen consumption rates of static cultures from microplate measurements of pericellular dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and bioengineering*, 86(7), 775–787.
- Hagman A., Säll T., Compagno C., Piskur J. 2013. Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. - *PLOS ONE* 8(7): e68734.
- Han T. X., Xu X. Y., Zhang M. J., Peng X., Du L. L. 2010. Global fitness profiling of fission yeast deletion strains by barcode sequencing. - *Genome Biol.* 11(6):R60.
- Haselbeck, R. J., & McAlister-Henn, L. 1993. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), 12116–12122.
- Hirabayashi, T., & Harada, T. 1971. Isolation and properties of α -ketoglutarate dehydrogenase complex from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45(6), 1369–1375. doi:10.1016/0006-291x(71)90172-0
- Hogg S., 2005. - *Essential microbiology*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Huang, T., Barclay, B. J., Kalman, T. I., Von Borstel, R. C., & Hastings, P. J. 1992. The phenotype of a dihydrofolate reductase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 121(1), 167-171.
- Hunte, C., Palsdottir, H., & Trumppower, B. L. 2003. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Letters*, 545(1), 39–46. doi:10.1016/s0014-5793(03)00391-0
- Ideker T., Thorsson V., Ranish J. A., Christmas R., Buhler J., Eng J. K., Bumgarner R., Goodlett D. R., Aebersold R., Hood L. 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. – *Science* 292(5518): 929-34.
- Isakova, E. P., Matushkina, I. N., Popova, T. N., Dergacheva, D. I., Gessler, N. N., Klein, O. I., ... & Saris, N. E. L. 2020. Metabolic remodeling during long-lasting cultivation of the *Endomyces magnusii* yeast on oxidative and fermentative substrates. *Microorganisms*, 8(1), 91.

- YeastGenome. 2022. <https://yeastgenome.org/>
- YeastPathways. 2022. <https://pathway.yeastgenome.org/>
- Yuen H.K., Princen J., Illingworth J., Kittler J. 1990. Comparative study of Hough transform methods for circle finding. - *Image and vision computing*, 8(1), pp.71-77.
- Johnson E. A. 2013. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. - *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 503-517.
- Jones E. W., Fink G. R. 1982. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. – In Strathern J. N., Jones E. W., Broach J. R. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 181-299.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., & Wood, P. M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(2-3), 179–195.
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. 2015. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 15(6), fov068.
- Kamrad S., Bähler J., Ralser, M. 2021. High-throughput, high-precision colony phenotyping with pyphe. – pre-print
- Kassaliete J. 2020. Purīnu patēriņš maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* purīnu sintēzes mutantos. Rīga. Latvijas Universitāte. 43.lpp.
- Kassaliete J., Zīle A., Ozoliņa Z., Kokina A., Liepiņš J. 2020. Use of baker's yeast purine auxotrophs for adenine quantification - in Abstracts of the 78th Scientific Conference of the University of Latvia. *Environmental and Experimental Biology*, 18(1), p.29.
- Keppler-Ross S., Noffz C., Dean N. 2008. A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. - *Genetics* 179(1):705-10.
- Khurana, V., & Lindquist, S. 2010) Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast?. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(6), 436-449.
- Kimura M. 1991. The neutral theory of molecular evolution: A review of recent evidence. - *The Japanese Journal of Genetics*, 66(4), 367–386.
- Koehler, R. N., Rachfall, N., & Rolfes, R. J. 2007. Activation of the ADE genes requires the chromatin remodeling complexes SAGA and SWI/SNF. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1474-1485.
- Kregiel, D. (2012). Succinate Dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*—The Unique Enzyme of TCA Cycle—Current Knowledge and New Perspectives.

- Kroneková, Z. 2005. Assembly of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: The role of Cbp3p and Cbp4p assembly factors.
- Kumari A. 2018. Chapter 17 - Purine Structures Sweet Biochemistry, Academic Press, Pages 89-91,
- Lee, Y. J., Jang, J. W., Kim, K. J., & Maeng, P. J. 2011. TCA cycle-independent acetate metabolism via the glyoxylate cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(2), 153-166.
- Li, X., Wang, X., & Snyder, M. P. 2019. Metformin affects heme function as a possible mechanism of action. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(2), 513-522.
- Ma, X. J., Wang, Y. S., Gu, W. P., & Zhao, X. 2017. The role and possible molecular mechanism of valproic acid in the growth of MCF-7 breast cancer cells. *Croatian medical journal*, 58(5), 349–357.
- Malina, C., Larsson, C., & Nielsen, J. 2018. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS yeast research*, 18(5), foy040.
- Mara, P., Fragiadakis, G. S., Gkountromichos, F., & Alexandraki, D. 2018. The pleiotropic effects of the glutamate dehydrogenase (GDH) pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-13.
- Martin, W.F., Garg, S. and Zimorski, V., 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678), p.20140330.
- Matecic, M., Smith Jr, D. L., Pan, X., Maqani, N., Bekiranov, S., Boeke, J. D., & Smith, J. S. 2010. A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS genetics*, 6(4), e1000921.
- Meunier J.R. Choder M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. - *Yeast* 15(12), 1159-1169.
- Miyatake, M., Kuno, T., Kita, A., Katsura, K., Takegawa, K., Uno, S., ... & Sugiura, R. 2007. Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast. *Genetics*, 175(4), 1695-1705.
- Miller A.W., Mitchell E., Befort C. and Dunham M. J. 2017. Dunham Lab Ministat Manual. <http://dunham.gs.washington.edu/protocols.shtml>

- Minard, K. I., & McAlister-Henn, L. 1991. Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Molecular and cellular biology*, 11(1), 370-380.
- Momeni B., Briley K.A., Fields M.W. and Shou W. 2013. Strong inter-population cooperation leads to partner intermixing in microbial communities. - *elife*, 2, p.e00230.
- Moriyama, S., Nishio, K., & Mizushima, T. 2018. Structure of glyoxysomal malate dehydrogenase (MDH3) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 74(10), 617-624.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. 2001. *Principles of Biochemistry*. 17.
- Nieto J., Woods R.A. 1983. Studies on mutants affecting amidophosphoribosyltransferase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Canadian Journal of Microbiology*, 29 (6): 681-688.
- Nijkamp J. F., van den Broek M., Datema E., de Kok S., Bosman L., Luttik M. A., Daran-Lapujad, P., Vongsangnak W., Nielsen J., Heijne W. H., Klaassen P., Paddon C. J., Platt D., Kötter P., van Ham R. C., Reinders M. J., Pronk J. T., de Ridder D., Daran J. M. 2012. De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. - *Microbial cell factories*, 11, 36.
- Nilsson, A., Pålman, I.-L., Jovall, P.-Å., Blomberg, A., Larsson, C., & Gustafsson, L. 2001. The catabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae* is preserved to a higher extent during carbon compared to nitrogen starvation. *Yeast*, 18(15), 1371–1381.
- Oberwinkler, F. R. A. N. Z. 2012. - Evolutionary trends in *Basidiomycota*. na.
- Oyedotun, K. S., & Lemire, B. D. 2004. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase: homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9424-9431.
- Orr, H. A. 2005. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 119-127.
- Ota, S., Horigome, K., Ishii, T., Nakai, M., Hayashi, K., Kawamura, T., ... & Kimura, T. 2009. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(2), 311-316.

- Palmieri, F., Agrimi, G., Blanco, E., Castegna, A., Di Noia, M. A., Iacobazzi, V., ... Walker, J. 2006. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9-10), 1249–1262.
- Pasternack, L. B., Littlepage, L. E., Laude Jr, D. A., & Appling, D. R. 1996. ¹³C NMR Analysis of the Use of Alternative Donors to the Tetrahydrofolate-Dependent One-Carbon Pools in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 326(1), 158-165.
- Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Vermeersch, L., Barrajon Simancas, N., Bisschops, M. M., ... & Verstrepen, K. J. 2018. The crabtree effect shapes the *q* lag phase during the switch between different carbon sources. *MBio*, 9(5), e01331-18.
- Petti, A. A., Crutchfield, C. A., Rabinowitz, J. D., & Botstein, D. 2011. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), E1089-E1098.
- Pfeiffer, T., & Morley, A. 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in molecular biosciences*, 1, 17.
- Pinson B., Vaur S., Sagot I., Couplier F., Lemoine S., Daignan-Fornier B. 2009. Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. – *Genes & Development*, 23(12): 1399–1407.
- Pronk J. T. 2002. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. - *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2095–2100.
- Raab, A. M., & Lang, C. 2011. Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioengineered bugs*, 2(2), 120–123.
- Rébora K., Laloo B., Daignan-Fornier B. 2005. Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. – *Genetics*, 170 (1): 61-70.
- Rébora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., & Daignan-Fornier, B. 2001. Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Molecular and cellular biology*, 21(23), 7901–7912.
- Reichardt, N., Barclay, A. R., Weaver, L. T., & Morrison, D. J. 2011. Use of Stable Isotopes To Measure the Metabolic Activity of the Human Intestinal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8009–8014. doi:10.1128/aem.05573-11

- Rezaei, M. N., Aslankoochi, E., Verstrepen, K. J., & Courtin, C. M. 2015. Contribution of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the glyoxylate shunt in *Saccharomyces cerevisiae* to succinic acid production during dough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 24-32.
- Rintala, E., Toivari, M., Pitkänen, JP. et al. Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 10, 461 2009.
- Rivas E.M., Gil de Prado E., Wrent P., de Silóniz M.I., Barreiro P., Correa E.C., Conejero F., Murciano A., Peinado J.M. 2014. A simple mathematical model that describes the growth of the area and the number of total and viable cells in yeast colonies. - *Letters in applied microbiology*, 59(6), pp.594-603.
- Sadowska-Bartosz, I., Pączka, A., Mołoń, M., & Bartosz, G. (2013). Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 13(8), 820–830.
- Salsaa, M., Pereira, B., Liu, J. *et al.* 2020. Valproate inhibits mitochondrial bioenergetics and increases glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* **10**, 11785
- Schapira, A.H., 2006. Mitochondrial disease. *The Lancet*, 368(9529), pp.70-82.
- Seif, Y., Choudhary, K.S., Hefner, Y., Anand, A., Yang, L. and Palsson, B.O., 2020. Metabolic and genetic basis for auxotrophies in Gram-negative species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(11), pp.6264-6273.
- Sherman F. 2002. - Getting started with yeast. - *Methods in enzymology*, 350: 3-41.
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. In *Methods in enzymology* (Vol. 350, pp. 3-41). Academic Press.
- Stahl G., Salem S. N., Chen L., Zhao B., Farabaugh P. J. 2004. Translational accuracy during exponential, postdiauxic, and stationary growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. - *Eukaryotic cell*, 3(2): 331–338.
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B., Swain, P. S., & Pilizota, T. 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific reports*, 6(1), 1-7.
- Stock, D. 1999. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science*, 286(5445), 1700–1705.
- Stockwell, S. R., Landry, C. R., & Rifkin, S. A. 2015. The yeast galactose network as a quantitative model for cellular memory. *Molecular bioSystems*, 11(1), 28-37.
- Tahara, E. B., Cunha, F. M., Basso, T. O., Della Bianca, B. E., Gombert, A. K., & Kowaltowski, A. J. 2013. Calorie restriction hysteretically primes aging *Saccharomyces cerevisiae* toward more effective oxidative metabolism. *PLoS One*, 8(2), e56388.

- Thatcher J. W., Shaw J. M., & Dickinson W. J. 1998. Marginal fitness contributions of nonessential genes in yeast. - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1): 253–257.
- Thompson, L. M., Sutherland, P., Steffan, J. S., & McAlister-Henn, L. 1988. Gene sequence and primary structure of mitochondrial malate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 27(22), 8393-8400.
- Thomsson, E., Larsson, C., Albers, E., Nilsson, A., Franzen, C. J., & Gustafsson, L. 2003. Carbon Starvation Can Induce Energy Deprivation and Loss of Fermentative Capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3251–3257.
- Tielens, A. G. ., Rotte, C., van Hellemond, J. J., & Martin, W. 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(11), 564–572.
- Váchová L., Čáp M. and Palková Z., 2012. Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. - *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- Váchová L., Hatáková L., Čáp M., Pokorná M., Palková Z. 2013. Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. - *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Van Uden N. 1985. Ethanol Toxicity and Ethanol Tolerance in Yeasts. - *Annual Reports on Fermentation Processes*, 11–58.
- Veiga, A., Arrabaça, J. D., & Loureiro-Dias, M. C. 2003. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Research*, 3(3), 239-245.
- Vermeersch L., Perez-Samper G., Cerulus B., Jariani A., Gallone B., Voordeckers K., Verstrepen K. J. et al. 2019. On the duration of the microbial lag phase. - *Current genetics*, 65(3): 721-727.
- Vowinckel, J., Hartl, J., Marx, H., Kerick, M., Runggatscher, K., Keller, M. A., ... & Ralser, M. 2021. The metabolic growth limitations of petite cells lacking the mitochondrial genome. *Nature metabolism*, 3(11), 1521-1535.
- Walden, E.A., Fong, R.Y., Pham, T.T., Knill, H., Laframboise, S.J., Huard, S., Harper, M.E. and Baetz, K., 2020. Phenomic screen identifies a role for the yeast lysine acetyltransferase NuA4 in the control of Bcy1 subcellular localization, glycogen biosynthesis, and mitochondrial morphology. *PLoS genetics*, 16(11), p.e1009220.
- Wang, Y., & Hekimi, S. 2016. Understanding Ubiquinone. *Trends in Cell Biology*, 26(5), 367–378.

- Warringer J., Blomberg A. 2003a. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Yeast*, 20(1): 53-67.
- Warringer J., Ericson E., Fernandez L., Nerman O. and Blomberg A. 2003b. High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. - *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(26): 15724-15729.
- Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., ... & Chandel, N. S. 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *elife*, 3, e02242.
- Wintersberger, U., & Hirsch, J. 1973. Induction of cytoplasmic respiratory deficient mutants in yeast by the folic acid analogue, methotrexate. *MGG Molecular & General Genetics*, 126(1), 61–70.
- Wiser M. J., Lenski R. E. 2015. A Comparison of Methods to Measure Fitness in *Escherichia coli*. - *PLOS ONE*, 10(5): e0126210.
- Zara, V., Conte, L., & Trumpower, B. L. 2009. Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), 89–96.
- Zengler K., & Zaramela L. S. 2018. The social network of microorganisms - how auxotrophies shape complex communities. - *Nature reviews. Microbiology*, 16(6): 383–390.
- Zhang, J., van den Herik, B.M. & Wahl, S.A. 2020. Alpha-ketoglutarate utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: transport, compartmentation and catabolism. *Sci Rep* 10, 12838.
- Zīle A. 2021. Metodes izstrāde raugu makrokoloniju augšanas dinamikas novērtēšanai. *Kursa darbs*. Rīga. Latvijas Universitāte. 49.lpp.

PIELIKUMI

1. pielikums

Pilnās sintētiskās (SD) barotnes recepte 1 litram.

Maisījums	Svars	Viela	Tīrības pakāpe	Ražotājs	Izcelsmes valsts
Sāļu maisījums 6,7g uz 900mL destilēta ūdens	100 mg	Kalcija hlorīda dihidrāts	99%	Sigma Aldrich	Vācija
	100 mg	Nātrija hlorīds	99% - 105%	Sigma Aldrich	Vācija
	500 mg	Magnija sulfāta septahidrāts	99%	Sigma Aldrich	Vācija
	1 g	Monokālija fosfāts	99,5% - 105,5%	Sigma Aldrich	Vācija
Metālu maisījums 1000x 1L destilēta ūdens (1mL uz 1L barotnes)	5 g	Amonija sulfāts	>99%	Sigma Aldrich	Vācija
	500 mg	Borskābe	LV	Reahim	Krievija
	40 mg	Vara sulfāta pentahidrāts	RG	Serva	
	100 mg	Kālija jodīds		Sarkandaugavas aptieka	Latvija
	200 mg	Dzelzs hlorīda sekstahidrāts	LV	Reahim	Krievija
Vitamīnu maisījums 1000x 1L destilēta ūdens (1mL uz 1L barotnes)	400 mg	Mangāna sulfāta monohidrāts	LV	Reahim	Krievija
	200 mg	Nātrija molibdāta dihidrāts	LV	Reahim	Krievija
	400 mg	Cinka sulfāta septahidrāts	LV	Reahim	Krievija
	2 mg	Biotīns	RG	Amresco	ASV
	400 mg	Kalcija pantotenāts	>98%	Sigma Aldrich	Vācija
20% 100mL glikozes šķīdums	2 mg	Folskābe	>97%	Sigma Aldrich	Vācija
	2 g	Inozīts	>99%	Sigma Aldrich	Vācija
	400 mg	Niacīns	>98%	Sigma Aldrich	Vācija
	200 mg	p-aminobenzoskābe	>99%	Sigma Aldrich	Vācija
	400 mg	Piridoksīns HCl	RG	BDH biochemical	Lielbritānija
	200 mg	Riboflavīns	RG	AppliChem	Vācija
	400 mg	Tiamīns HCl	>99%	Sigma Aldrich	Vācija
	22 g	Glikozes monohidrāts	>99%	Sigma Aldrich	Vācija
	85 mL ⁻¹ dH ₂ O				

LV – Laboratorijas vajadzībām

RG – Reāģenta pakāpe (angl. – *Reagent grade*)

2. pielikums

Dažādu barotņu pagatavošana 10mL.

Barotne	Šķīdums	Tilpums
SD+	SD N-	8 mL
	50g L ⁻¹ Amonija sulfāts	1 mL
	20% glikoze	1 mL
	100x adenīna hemisulfāts	100 mL
N-	SD N-	4 mL
	Sterils, destilēts ūdens	1 mL
	20% glikoze	1 mL
	100x adenīna hemisulfāts	100 mL
C-	SD N-	8 mL
	50g L ⁻¹ Amonija sulfāts	1 mL
	Sterils, destilēts ūdens	1 mL
	100x adenīna hemisulfāts	100 mL
ade-	SD N-	8 mL
	50g L ⁻¹ Amonija sulfāts	1 mL
	20% glikoze	1 mL

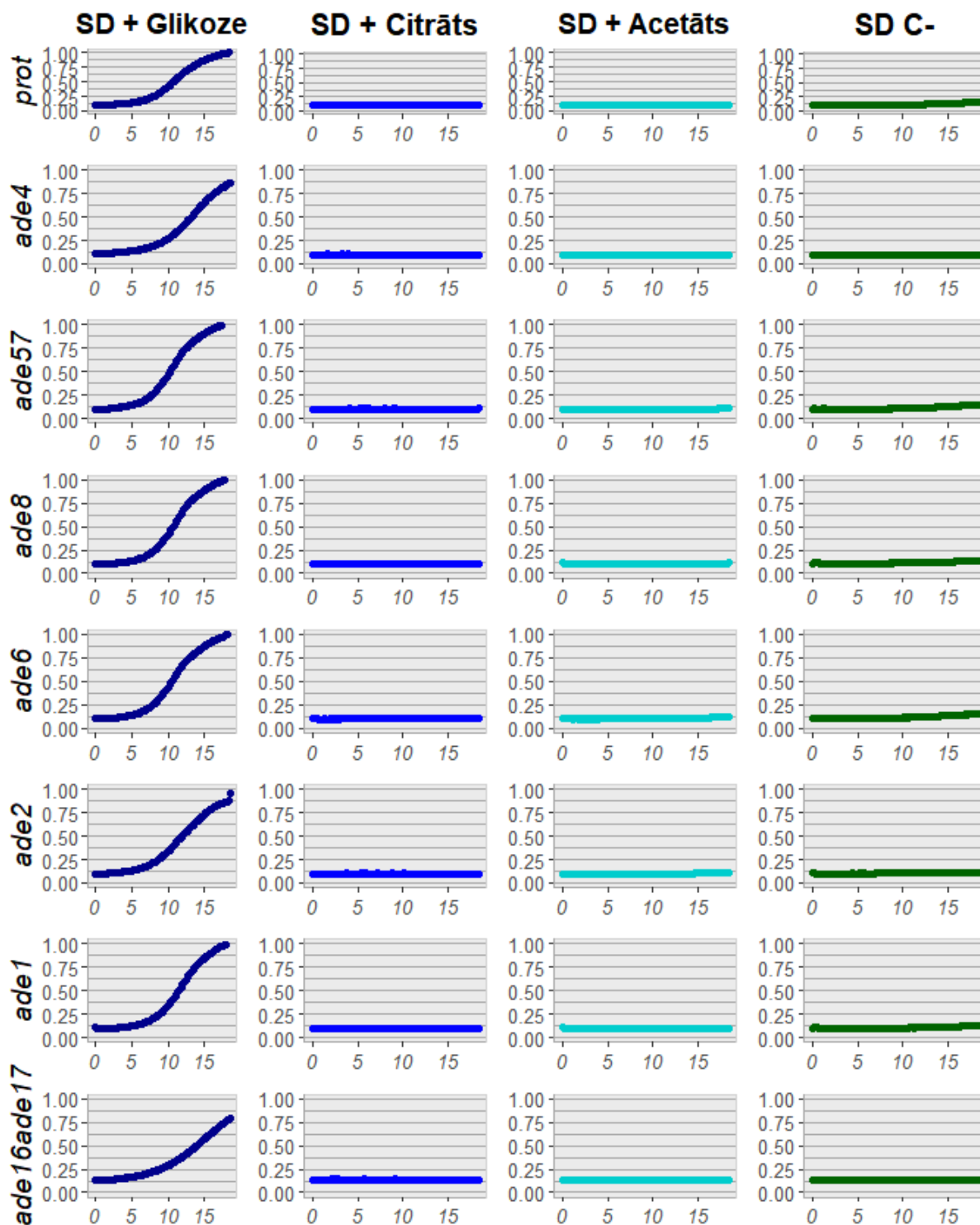
3. pielikums

S. cerevisiae purīnu *de novo* ceļa mutantu un izejas celma lag fāžu ilgums oglekļa maiņas eksperimentos.

Celms	Barotne	Lag, h		Lag (Galaktoze/Glikoze)
		Glikoze	Galaktoze	
<i>prot</i>	SD+	4,81 ±0,07	14,23 ±0,11	2,96 ±0,06
	C-	5,46 ±0,17	10,61 ±0,69	1,96 ±0,17
	N-	6,01 ±0,47	12,57 ±0,89	2,10 ±0,19
	ade-	5,01 ±0,26	13,61 ±1,37	2,67 ±0,25
<i>ade4</i>	SD+	5,60 ±0,06	12,59 ±0,11	2,25 ±0,04
	C-	6,06 ±0,07	11,57 ±0,14	1,91 ±0,04
	N-	6,51 ±0,12	11,94 ±0,03	1,84 ±0,03
	ade-	6,20 ±0,01	11,41 ±0,06	1,84 ±0,01
<i>ade57</i>	SD+	5,08 ±0,50	11,97 ±0,33	2,37 ±0,23
	C-	5,28 ±0,40	10,24 ±0,17	1,95 ±0,18
	N-	6,13 ±0,05	11,23 ±0,10	1,83 ±0,03
	ade-	5,56 ±0,60	10,79 ±0,37	1,96 ±0,23
<i>ade8</i>	SD+	5,41 ±0,11	12,51 ±0,21	2,31 ±0,09
	C-	5,81 ±0,00	11,40 ±0,26	1,96 ±0,04
	N-	6,59 ±0,06	11,88 ±0,06	1,80 ±0,02
	ade-	6,37 ±0,03	11,31 ±0,04	1,78 ±0,01
<i>ade6</i>	SD+	4,69 ±0,07	11,88 ±0,11	2,53 ±0,06
	C-	4,88 ±0,06	10,48 ±0,08	2,15 ±0,01
	N-	6,02 ±0,07	11,34 ±0,03	1,88 ±0,03
	ade-	5,65 ±0,21	11,00 ±0,61	1,95 ±0,18
<i>ade2</i>	SD+	5,56 ±0,05	12,75 ±0,17	2,29 ±0,05
	C-	5,74 ±0,04	11,21 ±0,03	1,95 ±0,01
	N-	6,73 ±0,08	12,15 ±0,27	1,81 ±0,05
	ade-	6,95 ±0,06	11,85 ±0,13	1,70 ±0,03
<i>ade1</i>	SD+	5,09 ±0,06	12,28 ±0,23	2,41 ±0,07
	C-	4,87 ±0,05	10,67 ±0,08	2,19 ±0,02
	N-	6,88 ±0,10	11,50 ±0,27	1,67 ±0,05
	ade-	6,91 ±0,43	11,80 ±0,15	1,71 ±0,09

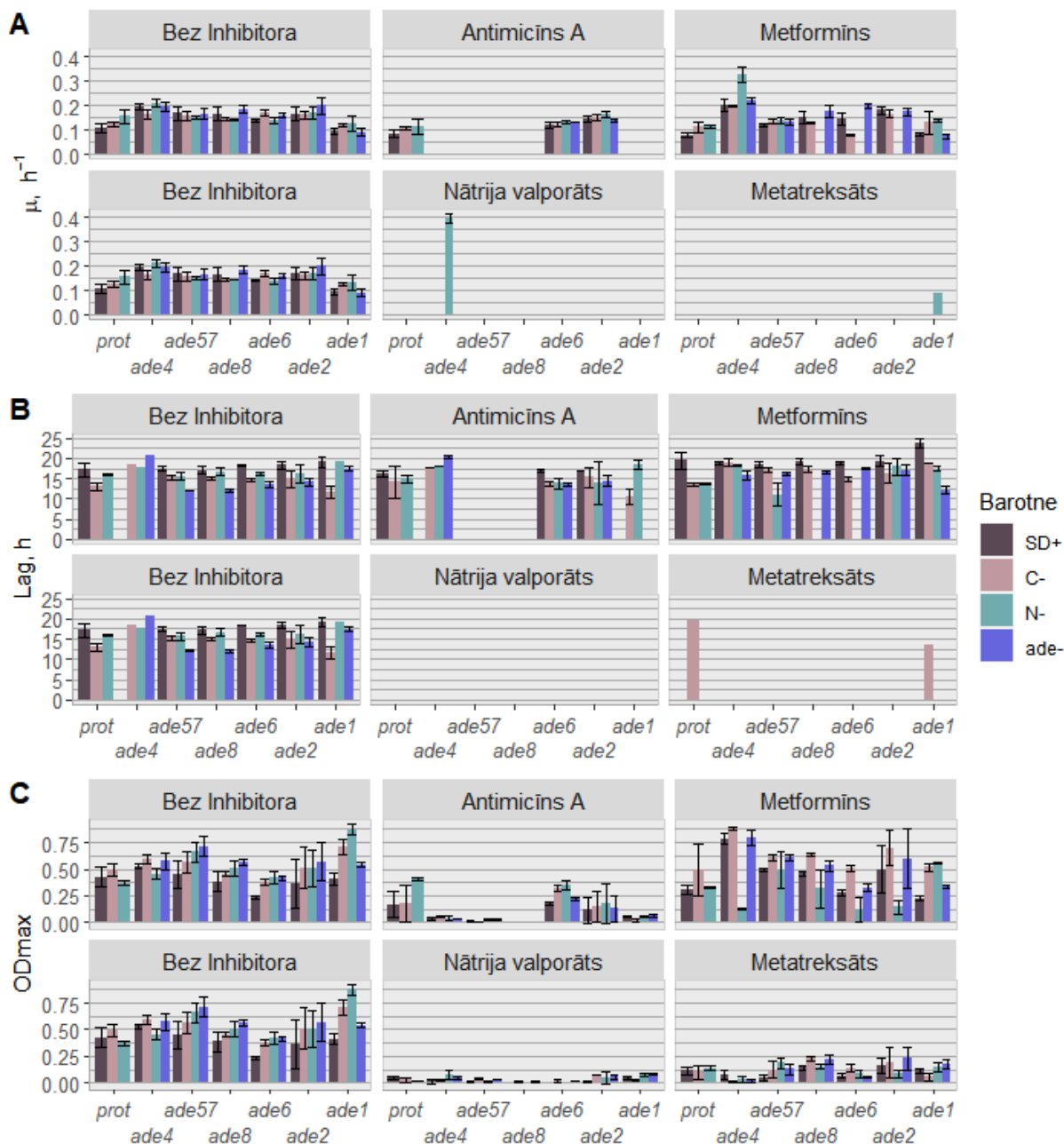
4. pielikums

S. cerevisiae augšana līknes uz glikozes, oksidatīvajiem substrātiem (citrāts un acetāts) un barotnē bez papildus pievienota oglekļa avota (SD C-) definētajā sintētiskajā barotnē (SD).



5. pielikums

S. cerevisiae purīnu *de novo* ceļa mutantu un izejas celma augšanas parametri SD barotnē ar galaktozi – **A.** specifiskais augšanas ātrums μ , h^{-1} . **B.** lag fāzes ilgums, h; **C.** maksimālais sasniegtais optiskais blīvums – inhibitoru klātbūtnē. Celmi sakārtoti purīnu *de novo* sintēzes ceļa secībā. Nogriežņi attēlo standartnovirzi.



6. pielikums

S. cerevisiae prototrofa un purīnu biosintēzes ceļa mutantu koloniju detekcijas laiks

un radiālais augšanas ātrums

Celms	Barotne	Inhibitors	Detekcijas laiks, h	Rādiusa augšanas ātrums, $\mu\text{m h}^{-1}$
<i>prot</i>	SD+	Bez Inhibitora	15,58 \pm 1,78	16,37 \pm 2,58
		Metformīns	21,00 \pm 2,11	20,90 \pm 4,46
		Nātrija valproāts	38,18 \pm 13,99	4,07 \pm 4,68
	C-	Bez Inhibitora	13,80 \pm 0,45	16,87 \pm 1,34
		Metformīns	20,75 \pm 0,50	19,79 \pm 2,41
		Nātrija valproāts	27,80 \pm 0,84	3,42 \pm 0,81
	N-	Bez Inhibitora	12,71 \pm 0,49	16,72 \pm 2,33
		Metformīns	24,00 \pm 0,63	19,21 \pm 2,36
		Nātrija valproāts	28,17 \pm 0,75	4,14 \pm 2,03
<i>ade57</i>	SD+	Bez Inhibitora	17,00 \pm 0,00	17,91 \pm 0,97
		Metformīns	23,00 \pm 0,00	26,01 \pm 2,34
		Nātrija valproāts	68,20 \pm 3,03	nenoteikts nenoteikts
	C-	Bez Inhibitora	13,86 \pm 1,07	16,91 \pm 1,51
		Metformīns	20,43 \pm 0,98	24,06 \pm 2,01
		Nātrija valproāts	52,43 \pm 3,21	nenoteikts nenoteikts
	N-	Bez Inhibitora	15,00 \pm 0,00	17,77 \pm 1,14
		Metformīns	21,00 \pm 0,00	21,07 \pm 2,24
		Nātrija valproāts	neaug neaug	neaug neaug
	ade-	Bez Inhibitora	14,43 \pm 0,98	16,13 \pm 1,71
		Metformīns	21,00 \pm 0,00	19,93 \pm 3,73
		Nātrija valproāts	neaug neaug	neaug neaug
<i>ade8</i>	SD+	Bez Inhibitora	17,00 \pm 0,00	14,87 \pm 1,78
		Metformīns	23,00 \pm 0,00	19,12 \pm 2,28
		Nātrija valproāts	51,00 \pm 0,00	nenoteikts nenoteikts
	C-	Bez Inhibitora	17,29 \pm 0,76	16,27 \pm 2,36
		Metformīns	21,29 \pm 0,76	21,03 \pm 1,76
		Nātrija valproāts	51,00 \pm 0,00	nenoteikts nenoteikts
	N-	Bez Inhibitora	16,14 \pm 1,07	15,65 \pm 1,31
		Metformīns	22,71 \pm 0,76	21,83 \pm 2,03
		Nātrija valproāts	neaug neaug	neaug neaug
	ade-	Bez Inhibitora	17,00 \pm 0,00	18,63 \pm 1,01
		Metformīns	20,71 \pm 0,76	25,63 \pm 2,46
		Nātrija valproāts	neaug neaug	neaug neaug
<i>ade6</i>	SD+	Bez Inhibitora	14,14 \pm 0,38	12,15 \pm 1,16
		Metformīns	27,14 \pm 3,98	9,18 \pm 2,81
		Nātrija valproāts	31,80 \pm 2,17	2,80 \pm 0,71
	C-	Bez Inhibitora	13,50 \pm 0,55	14,22 \pm 0,80
		Metformīns	26,71 \pm 4,42	9,47 \pm 3,29
		Nātrija valproāts	27,43 \pm 1,27	5,86 \pm 3,13
	N-	Bez Inhibitora	13,00 \pm 0,00	14,51 \pm 0,85
		Metformīns	25,86 \pm 3,29	11,99 \pm 3,39
		Nātrija valproāts	27,88 \pm 2,10	2,10 \pm 1,82
	ade-	Bez Inhibitora	12,00 \pm 0,00	17,05 \pm 0,87
		Metformīns	22,43 \pm 2,70	12,75 \pm 6,33
		Nātrija valproāts	25,13 \pm 1,36	2,39 \pm 0,68
<i>ade2</i>	SD+	Bez Inhibitora	14,83 \pm 0,41	16,37 \pm 0,90
		Metformīns	24,86 \pm 1,68	18,81 \pm 1,23
		Nātrija valproāts	32,20 \pm 2,39	7,42 \pm 8,12
	C-	Bez Inhibitora	13,00 \pm 0,00	13,58 \pm 1,06
		Metformīns	21,67 \pm 2,07	12,50 \pm 1,05
		Nātrija valproāts	23,88 \pm 1,13	3,37 \pm 2,37
	N-	Bez Inhibitora	12,29 \pm 0,49	15,88 \pm 0,85
		Metformīns	23,00 \pm 1,63	14,59 \pm 0,98
		Nātrija valproāts	25,50 \pm 1,77	3,91 \pm 4,96
	ade-	Bez Inhibitora	12,00 \pm 0,00	13,94 \pm 0,70
		Metformīns	19,29 \pm 2,06	13,49 \pm 1,65
		Nātrija valproāts	22,75 \pm 2,76	3,75 \pm 2,11
<i>ade1</i>	SD+	Bez Inhibitora	19,00 \pm 0,00	15,55 \pm 1,07
		Metformīns	23,00 \pm 0,00	21,02 \pm 2,33
		Nātrija valproāts	27,40 \pm 1,67	31,27 \pm 4,81
	ade-	Bez Inhibitora	19,40 \pm 0,89	17,77 \pm 2,71
		Metformīns	22,60 \pm 0,89	25,57 \pm 2,58
		Nātrija valproāts	56,20 \pm 1,79	nenoteikts nenoteikts

7. pielikums

S. cerevisiae prototrofa un purīnu biosintēzes ceļa mutantu izocitrāta dehidrogenāzes; α -ketoglutarāta dehidrogenāzes; malāta dehidrogenāzes aktivitāte.

Celms	Malāta dehidrogenāze	α-ketoglutarāta dehidrogenāze	Izocitrāta dehidrogenāze
<i>prot</i>	0,137 \pm 0,033	0,095 \pm 0,015	0,090 \pm 0,007
<i>ade4</i>	0,127 \pm 0,031	0,098 \pm 0,007	0,088 \pm 0,009
<i>ade57</i>	0,073 \pm 0,010	0,073 \pm 0,004	0,065 \pm 0,005
<i>ade8</i>	0,080 \pm 0,021	0,079 \pm 0,010	0,089 \pm 0,010
<i>ade6</i>	0,203 \pm 0,048	0,058 \pm 0,003	0,095 \pm 0,008
<i>ade2</i>	0,092 \pm 0,063	0,023 \pm 0,002	0,090 \pm 0,004
<i>ade1</i>	0,100 \pm 0,022	0,098 \pm 0,005	0,062 \pm 0,005
<i>ade16ade17</i>	0,033 \pm 0,006	0,037 \pm 0,002	0,018 \pm 0,002

Bakalaura darbs “Maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* purīna auksotrofijas ietekme uz mitohondriju metabolismu” 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.

Autore: Anitra Zīle

24.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāji:

Mg.biol. Zane Ozoliņa

Dr.biol. Jānis Liepiņš

24.05.2022.

Recenzents: Dr.biol. Reinis Rutkis

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 24.05.2022.

Lietvede: