

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

MAIZES RAUGA ADENĪNA BIOSINTĒZES CEĻA
MUTĀCIJU IETEKME UZ OKSIDATĪVĀ UN KARSTUMA
STRESU IZTURĪBU

Bakalaura darbs

Autors: Sandra Seimuškina
Stud. apl. nr. SS18097
Darba vadītājs: Mag. biol. Zane Ozoliņa

RĪGA 2021

KOPSAVILKUMS

Maizes raugs ir nozīmīgs modeļorganisms, lai praktiski pētītu adenīna biosintēzes ceļa mutāciju ietekmi uz oksidatīvā un karstuma stresu izturību, nepievienojot tiem barības vielas. Bakalaura darba ietvaros pētīta adenīna biosintēzes ceļa mutantu ietekme uz oksidatīvo un karstuma stresu, katalāzes un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes enzīmu aktivitāte.

Vispirms atrasti optimālie ilgumi šūnu pakļaušanai stresiem, tad noskaidrots, ka purīna un slāpekļa badināšana palielina stresa izturību neatkarīgi no mutācijas vietas adenīna sintēzes ceļā. Iegūtie rezultāti norāda, ka katalāze uzrāda augstāku aktivitāti pie augstākas oksidatīvā stresa izdzīvotības W303 un Δade , $\Delta ade2$ celmiem, bet ne $\Delta ade8$, savukārt glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte nekorelē ar oksidatīvā stresa izturību. Visiem adenīna biosintēzes mutāciju celmiem netika atrastas kopīgas tendences katalāzes un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes mērījumos.

Atslēgas vārdi: maizes raugs, karstuma, oksidatīvā stresa izturība, katalāze, glikozes 6-fosfāta dehidrogenāze.

SUMMARY

Budding yeast is an important model organism for the practical study of the role of adenine biosynthesis mutations for oxidative and heat stress tolerance without added nutrients.

In this work we studied the effects of adenine biosynthesis pathway mutants during the heat and oxidative stress and catalase and glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme activity.

Optimal durations of cell exposure to stress were first found, then it was discovered that purine and nitrogen starvation increases stress resistance regardless of the site of mutation in the pathway of adenine synthesis.

The obtained results indicate that catalase shows higher activity and higher oxidative stress resistance in W303 and $\Delta ade4$, $\Delta ade2$ strains, but not in $\Delta ade8$. Glucose 6-phosphate dehydrogenase activity does not correlate with oxidative stress survival. No common trends were found for catalase and glucose 6-phosphate dehydrogenase measurements for all adenine biosynthetic mutation strains.

Keywords: budding yeast, heat, oxidative stress resistance, catalase, glucose 6-phosphate dehydrogenase.

SATURS

Ievads.....	5
1. Literatūras apskats	6
1.1. Maizes raugs <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.2. Adenīna metabolisma ceļš	7
1.3. Auksotrofija	9
1.4. Mākslīgā un dabiskā barības vielu limitācija.....	9
1.5. Stress.....	10
1.5.1. Oksidatīvais stress.....	10
1.5.2. Karstuma stress	12
2. Materiāli un metodes	14
2.1. Iekārtas un materiāli.....	14
2.1.1 Iekārtas	14
2.1.2 Reaģenti.....	15
2.2. Izmantotie raugu celmi	16
2.3. Izmantotās barotnes	16
2.4. Rauga kultivēšana	17
2.5. Augšanas dinamika	18
2.6. Celmu subletālā izdzīvotības noteikšana	19
2.7. Enzīmu aktivitātes mērījumi	19
2.7.1. Glikozes 6-fosfāta dehidrogēnaze	19
2.7.2. Katalāze.....	20
2.8. Izmantotās statistiskās metodes	20
3. Rezultāti.....	21
3.2. Badināšanas ietekme uz šūnu augšanas dinamiku.....	21
3.3. Stresa apstākļu optimizācija.....	22
3.4. Adenīna biosintēzes ietekme uz karstuma stresa izturību.....	24
3.5. Adenīna biosintēzes ietekme uz oksidatīvā stresa izturību.....	26
3.6. Glikozes 6-fosfāta dehidrogēnāzes aktivitāte	26
3.7. Katālāzes aktivitāte	27
4. Diskusija	29
5. Secinājumi	32
6. Pateicības	33
7. Literatūras saraksts	34
Pielikumi	

IEVADS

Maizes raugs ir viens no visvairāk pētītajiem mikroorganismiem. Bieži *S. cerevisiae* pētniecībā tiek izmantoti auktrofī celmi, kuriem ir izslēgts kāds biosintēzes gēns, kā dēļ jāpievieno papildus barotnei metabolīts, ko raugs nespēj sintezēt.

Nejaušām mutācijām ir liela loma evolūcijas procesā. Daļa no mutācijām rodas kodējošās gēnu sekvencēs, bet organisms tāpat var izdzīvot un pat iegūt izdzīvošanas priekšrocības. Purīna auktrofī ir sastopami gan viensūnu, gan daudzšūnu organismos. Bieži tie ir parazītiski organismi, kas saņem purīnus no saimniekorganisma, piemēram, *Toxoplasma gondii*. Pētījumi par adenīna auktrofiju maizes raugā varētu noderēt, lai interpretētu adenīna auktrofiju arī citos organismos.

Šajā darbā ir izmantotas trīs dažādas adenīna biosintēzes ceļa mutācijas. Ir zināms, ka adenīna badinātas šūnas uzrāda lielāku stresa izturību un aptur šūnu ciklu G0/G1 fāzē (Boer et al. 2008).

Darbā pētīts, kā mainās rauga šūnu fenotips adenīna biosintēzes ceļa mutantiem, pakļaujot karstuma un oksidatīvajam stresam adenīna un slāpekļa avota badinātas šūnas.

Darba mērķis: Noskaidrot maizes rauga adenīna biosintēzes ceļa mutāciju ietekmi uz oksidatīvo un karstuma stresu izturību uz W303 prototrofa celma fona.

Darba uzdevumi:

1. Eksperimentāli atrast optimālo karstuma un oksidatīvā stresa apstrādes ilgumu;
2. Noteikt optiskā blīvuma atkarību no šūnu skaita mililitrā dažādiem adenīna ceļa mutantiem atšķirīgos audzēšanas apstākļos;
3. Eksperimentāli noskaidrot adenīna biosintēzes ceļa mutantu izdzīvotību pēc pakļaušanas karstuma un oksidatīvā stresam;
4. Raksturot saistību starp adenīna biosintēzes ceļa mutantu oksidatīvā stresa izturību un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes un katalāzes aktivitāti.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Maizes raugs *Saccharomyces cerevisiae*

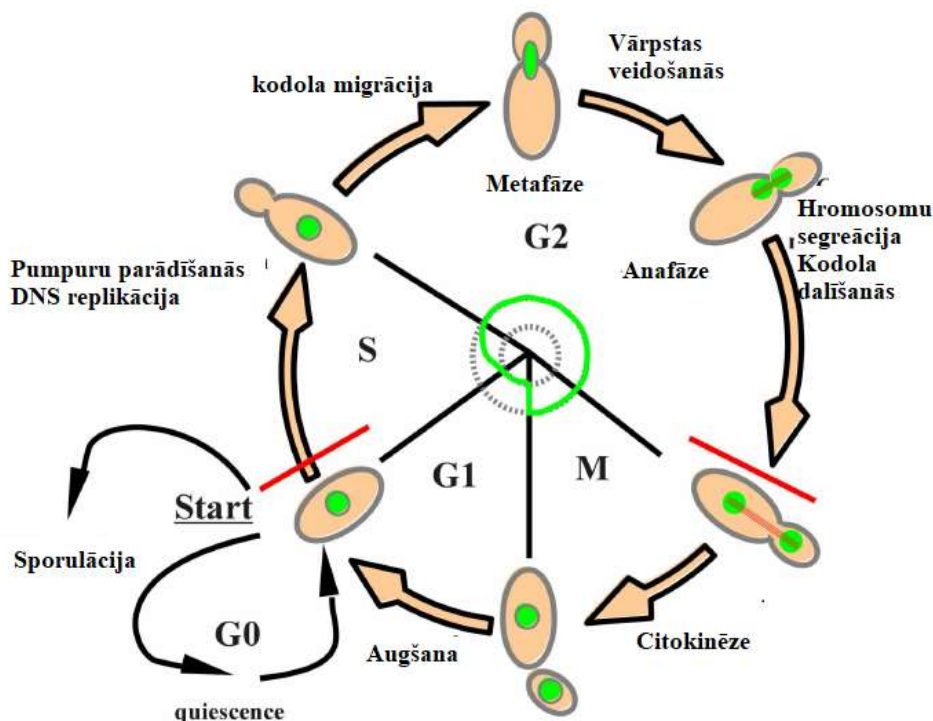
Maizes raugs *Saccharomyces cerevisiae* ir vienšūnas organisms, kas sastāv no membrānu saistītām norobežotām organelām- kodola, mitohondrija, endoplazmatiskā tīkla u.c. (Duina et al. 2014, Walker et al. 2016). Maizes raugam ir attīstīta metabolisma kontroles sistēma, kas novērtē barības vielu pieejamību, nepieciešamo oglekli, slāpekli u.c, lai radītu jaunas šūnas (Santangelo 2006). Tas var izmantot dažādas vielas kā barības vielu avotus (Smets et al. 2010). Raugiem nepieciešamie barības elementi ir slāpekļis, ogleklis, sērs, kālijs u.c, kā arī neorganiskie joni un dažādi augšanas faktori (Walker et al. 2016).

Parasti organismi spēj sintezēt visas nepieciešamās uzbūves struktūras biomasai. Rauga šūnas labāk patērē glikozi vai fruktozi, nevis di- un trisaharīdus, piemēram, saharozi, rafinozi vai trehalozi. Raugi izmanto arī dažādus slāpekļa avotus. Lielākā daļa raugu celmu dod priekšroku glutamīnam vai amonijam (Broach 2012).

S. cerevisiae ir eikariots, kas pazīstams kā modeļorganisms, kura genomu var viegli manipulēt (Gomes et al. 2007). Raugs ir vienkāršs organisms, tādēļ tiek izmantots, lai pētītu genotipa un fenotipa attiecības eikariotu šūnās (Sherman 2002, Botstein et al. 2011). Raugi ir zināmi kā prototrofi mikroorganismi, tomēr ir izstrādāti liels skaits auktrofo raugu celmu un tie ir plaši izmantoti šūnu un molekulārajiem pētījumiem (Gomes et al. 2007) Maizes raugs ir nozīmīgs cilvēcei, pateicoties tā fermentatīvām īpašībām. Šo raugu var izmantot pārtikas, dzērienu ražošanā, kā arī bioetanolā ražošanā. (Parapouli et al. 2020).

Rauga šūnas lielu daļu laika atrodas miera stāvoklī, kas rodas viena vai vairāku uzturvielu bada dēļ (Broach 2012). Raugs spēj optimāli augt ar barības vielām bagātā vidē, kā arī spēj ierosināt miera fāzi, ko sauc arī par stacionāro fāzi, kad trūkst barības vielu. Augšanas ātrums un šūnu dalīšanās ir atkarīga no substrāta daudzveidības (Alberghina et al. 2012).

Raugi var dalīties mitotiski un meiotiski. Raugu šūnu vairošanās notiek gan dzimumiski, notiekot sporulācijai, gan bezdzimumiski- pumpurojoties, kā rezultātā veidojas jauna šūna atdaloties no vecās šūnas (Alberghina et al. 2012). Barības vielu trūkuma dēļ notiek sporulācija. No vienas diploīdas šūnas rodas četras stresa izturīgākas haploīdas šūnas (Neiman 2011).



1. attēls. *Saccharomyces cerevisiae* dzīves cikls (ar izmaiņām no Delobel&Tesniere 2014).

Figure 1. *Saccharomyces cerevisiae* life cycle (with changes from Delobel&Tesniere 2014).

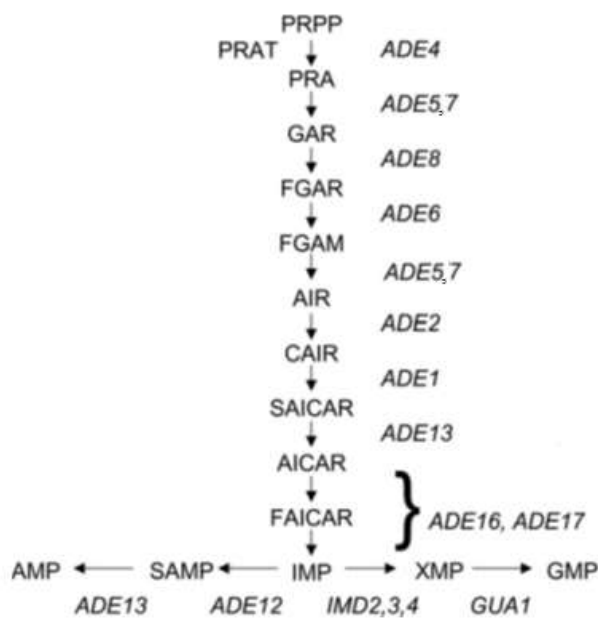
Rauga šūnas sāk pumpuroties un ieiet S fāzē, kad augšanas apstākļi G1 fāzē ir labvēlīgi. Kad šūnas sasniedz noteikto izmēru un ir pietiekami daudz barības vielu G1 fāzes beigās, tiek ierosināts S fāzes starts. Rauga šūnas sāk pumpuroties, notiek DNS replikācija un šūnas gatavojas mitozei un citokinēzei. Ja raugs pakļauts oksidatīvajam stresam vai lipīdu peroksidācijai, tad šūnas kavē ieešanu G1 fāzē., jo šūnām vispirms jānovērš bojājumi (Chiu et al. 2011).

1.2. Adenīna metabolisma ceļš

Biosintēzes ceļu regulācija notiek ģenētiskā līmenī un enzīmu līmenī (Jones et al. 1982, Tibbetts et al. 1997 cit. pēc Rolfes 2006). *S. cerevisiae* nepieciešams adenīns vairākiem procesiem, Tam ir īpaši liela nozīme šūnu metabolismā. Adenīns tieši vai netieši ir būtisks pamatelements nukleīnskābēm un starpproduktiem ar augstu enerģētisko vērtību (VanDusen et al. 1997).

Adenīns ir purīna bāze, kas veido vienu no četriem nukleotīdiem, kas ir atrodams gan DNS, gan RNS. Adenīns veido ūdeņraža saites ar timīnu (Urry et al. 2017). Adenīns ir ATF sastāvā kopā ar ribozi, trifosfātu, kā arī ar flavīna adenīna dinukleotīdu jeb FAD, kas ir svarīgs elektronu akceptors oksidēšanas un reducēšanas reakcijās. Adenīna difosfāts jeb ADF ir svarīgs metabolisma procesiem un enerģijas plūsmai šūnās (Berg. et al. 2015).

Nukleotīdu sintēze notiek pa *de novo* ceļu un NAD reģenerācijas no tā nikotīnamīda norādīšanās produktiem (no angļu val. – *salvage pathway*). Reģenerācijas ceļš izmanto purīna bāzes no ārējas vides, tās pārveidojot par nukleotīdiem. Ir iespējams arī atkārtoti izmantot nukleozīdus un nukleotīdus, kas ir radušies noārdīšanas procesā. Rauga šūnas spēj arī pārveidot adenīnu saturošus nukleotīdus par guanīnu saturošiem nukleotīdiem (Rolfes 2006).



2.attēls. Purīna biosintēzes ceļa shēma (Rolfes 2006).

Figure 2. Scheme of purine biosynthesis (Rolfes 2006)

Purīna biosintēzes ceļu pētījumi *S. cerevisiae* atklāj, ka visi gēni kodē enzīmus, kas nepieciešami AMP jeb adenozīna monofosfāta *de novo* biosintēzei, tiek represēti transkripcijas līmeni ar ekstracelulāro purīnu klātbūtni. *ADE* gēnu aktivācijai nepieciešami divi transkripcijas faktori Bas1p un Bas2p. SAICAR jeb sukcinilaminoimidazolkarboksamīda riboze un AICAR jeb 5'-fosforibozil-4-karboksamīda-5-amino-imidazols aktivē *ADE* gēnu ekspresiju, mijiedarbojoties ar Bas1p un Bas2p transkripcijas faktoriem (Rébora et al. 2001, Rébora et al. 2005). Raugos *ADE* gēni *ADE1*, *ADE2*, *ADE4*, *ADE5,7*, *ADE6*, *ADE8*, *ADE12*, *ADE13*, *ADE16* un *ADE17* kodē *de novo* ceļu līdz IMP (inozīna monofosfāts) un tālāk uz AMP (Jones et al. 1982, Tibbetts et al. 1997 cit. pēc Rolfes 2006).

Adenīna biosintēzē bojāts rauga *ade2* mutants veido sarkanās krāsas kolonijas, taču ja tiek bojāta mitohondriju oksidatīvā metabolisma funkcija, *ade2* celmu kolonijas kļūst baltas. (Kim et al. 2002). Šāds process ir novērojams arī *ade1* mutantos. Sarkanās krāsas attīstībai *ade1* un *ade2*

mutantu raugā ir nepieciešams samazināts glutationa daudzums, kas palīdz starpproduktu metabolītu P-ribosilaminoimidazola karboksilātu (CAIR) transportēt vakuolās, kas attīsta sarkano krāsu (Bharathi et al. 2016).

1.3. Auksotrofija

Auksotrofs mikroorganisms ir mutants, kas ir zaudējis spēju sintezēt sev nepieciešamo metabolītu, tāpēc ir nepieciešams pievienot auksotrofo vielu tādā daudzumā, lai nerastos barības vielu trūkums. Prototrofam nav nepieciešams pievienot papildus barības vielas, kā tas ir nepieciešams auksotrofiem raugiem (Pronk 2002).

Auksotrofo gēnu marķieri inaktivētu gēnus, kas sintezē enzīmu ceļu, kā rezultātā rodas auksotrofs faktors. Auksotrofos celmus var badināt, nepievienojot metabolītus, piemēram, adenīnu, metionīnu, leicīnu u.c. (Petti et al. 2011). Auksotrofam celmam auksotrofo barības vielu trūkums var izraisīt šūnu darbības traucējumus, kas negatīvi ietekmē biomasas veidošanos, stresa reakciju un izdzīvotību (Gomes et al. 2007).

Adenīna auksotrofija ir plaši izmantots ģenētiskais marķieris haploīdo raugu celmos (Pronk 2002). Izmantojot purīna auksotrofos rauga celmus, ir iespējams izpētīt evolucionāro ceļu no purīna prototrofijas uz purīna auksotrofiju. Turklāt, izpētot purīna auksotrofo badu, varētu palīdzēt jaunu medikamentu ražošanā, kas saistīti ar purīna auksotrofiju organismiem, piemēram, vēzi vai iekššūnu parazītiem (Yuen et al. 2007, Kokina et al. 2019).

1.4. Mākslīgā un dabiskā barības vielu limitācija

Raugiem visbiežāk izšķir divu veidu barības vielu limitācijas– mākslīgo un dabisko. Par dabiskām barības vielu limitācijām sauc badināšanu bez galvenajiem barības vielu avotiem, kā ogleklis, slāpekļis, sērs, fosfors u.c. To arī sauc par dabisko barības vielu limitāciju, jo raugs dabiskos apstākļos var saskarties ar barības vielu trūkumu (Saldanha et al. 2004, Petti et al. 2011). Par mākslīgo barības vielu limitāciju devē auksotrofo raugu celmu badināšanu, nepievienojot tam nepieciešamos metabolītus, kurus raugs pats nespēj sintezēt (Petti et al. 2011).

Raugu izdzīvotība ir atkarīga no tā, kādas barības vielas trūkst. M. Boer un kolēģi (Boer et al. 2008) pētījumā novēroja, ka, ja leicīna vai uracila auksotrofam celmam trūkst leicīns vai uracils, šūnām novērojama augstāka letalitāte nekā tad, ja šūnām trūkst fosfāta vai sulfāta, savukārt A. Petti un kolēģi (Petti et al. 2011) novēroja, ka daži metionīna auksotrofi bez metionīna veido tādu pašu atbildes reakciju kā fosfāta vai sulfāta badinātas šūnas. Šūnu cikls tiek apstādināts, samazinās glikozes patēriņš un šūnas izdzīvo labāk. *S. cerevisiae* šūnas, kurām ir adenīna auksotrofija, adenīna badošanas rezultātā kļūst stresa izturīgākās, kā arī ilgtermiņā izdzīvotība ir augstāka nekā

leicīna badinātiem lecīna auksotrofiem, kā arī tiek novērota šūnu izmēra palielināšanās (Kokina et al. 2014).

1.5. Stress

Visiem organismiem ir jāpielāgojas apkārtējās vides apstākļiem, lai nodrošinātu izdzīvošanu. Visbiežāk raugiem stresu izraisa karstuma stress, oksidatīvais stress vai glikozes trūkums. Stresa atbildes reakciju regulē vispārīgie transkripcijas faktori *Msn2* un *Msn4* (Yamamoto et al. 2008). Karstuma un oksidatīvais stress vidēji samazina cikliskā adenozinā monofosfāta jeb cAMP līmeni, destabilizējot Ras aktivatoru (Wang et al. 2004). Raugam iestājoties stacionārajai fāzei, šūnu sienas kļūst biežākas, samazinās metabolisms, transkripcija un translācija, kā arī palielinās stresa izturība (Allen et al. 2006). Dabiski badinātām šūnām ir novērota labāka izdzīvotība nekā mākslīgi badinātām šūnām (Boer et al. 2008).

Ja rauga šūnas iepriekš ir pakļautas vieglam stresam, tās pielāgojas un iegūst stresa izturību. Šis ir novērojams dažādos organismos, tai skaitā raugiem. D. Berry and A. Gasch (2008) atklāja, ka gēnu ekspresijas atbildes reakcija uz stresu ir mazāka, ja šūnas ir pakļautas iepriekš stresam. Celmi, kuriem nav *Msn2* un/vai *Msn4* transkripcijas faktoru, stresa izturību neiegūst, ja tie ir iepriekš pakļauti vieglam stresam (Berry and Gasch 2008).

Viszināmākie stresa atbildes reakcijas mehānismi ietver:

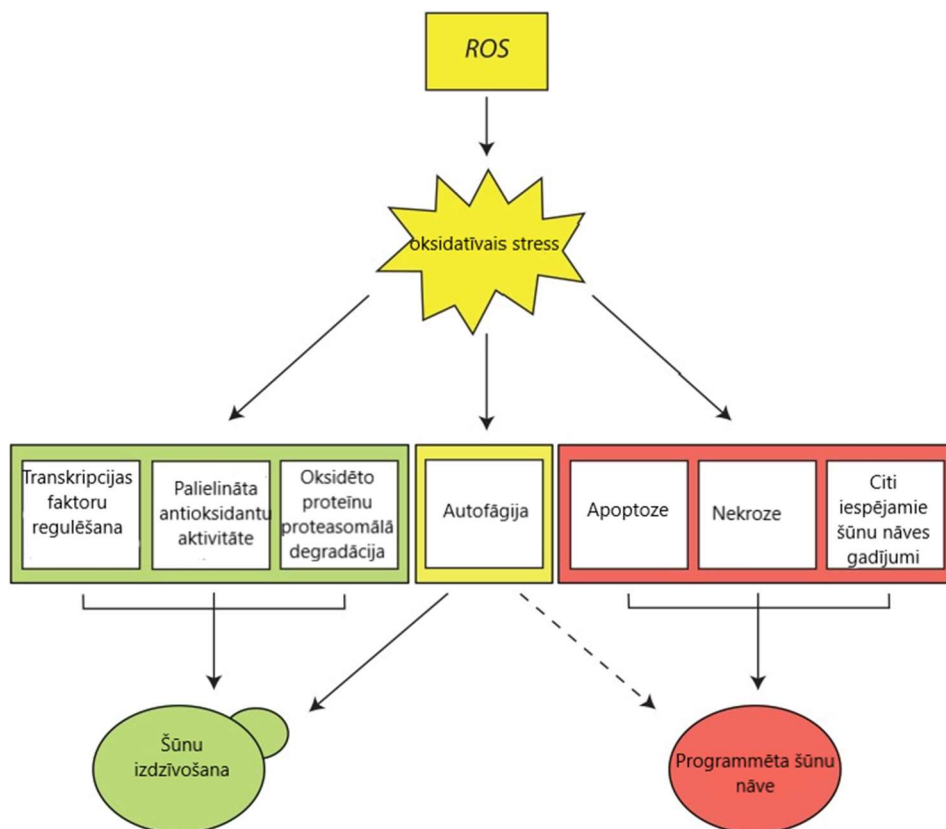
1. Karstuma šoka proteīnu aktivāciju;
2. Ubikvitīna-proteasomu ceļa aktivāciju;
3. Šūnu sienas integritātes uzlabošanu, lai nodrošinātu membrānu stabilitāti;
4. Antioksidantu aizsardzības uzsākšanu pret oksidatīvo bojājumu, kas rodas pēc karstuma šoka (Xiao et al. 2018).

1.5.1. Oksidatīvais stress

Lielākā daļa dzīvo organismu ir atkarīgi no skābekļa. Dzīvajiem organismiem ir jāizstrādā vairāki antioksidanti, lai pasargātu šūnas no oksidatīvajiem bojājumiem. Raugs var aizsargāt šūnas pret oksidatīvo stresu ar antioksidantiem, taču nevar aizsargāt pret pēkšņu oksidatīvo šoku. Ja šūnu antioksidantu aizsargspēja ir vāja, tad šūnās uzkrājas reaktīvās skābekļa formas (ROS), kas noved pie oksidatīvā stresa. Tas ir stāvoklis, kad starp prooksidantiem un antioksidantiem ir nelīdzsvarotība jeb prooksidanti ir vairākumā, kā rezultātā šūnas cieš oksidatīvos bojājumus (Farrugia and Balzan 2012). Oksidatīvais stress rodas brīdī, kad šūnas nespēj tikt galā ar klātesošo oksidantu, piemēram, ūdeņraža peroksīdu. Ūdeņraža peroksīds (H_2O_2) ir molekula, kas veidojas, kā aerobās elpošanas blakusprodukts. Tas var sabojāt šūnas, izraisot proteīnu, lipīdu bojājumus,

bet tam ir arī liela nozīme kā signālmolekulai daudzu bioloģisko procesu regulēšanai (Dickinson & Schweizer, 2004).

Visi organismi ir pakļauti reaktīvā skābekļa formu (ROS) veidošanās iespējai aeroba metabolisma procesos. Molekulārais skābeklis ir neaktīvs, taču var daļēji reducēties, veidojot vairākas ROS, tai skaitā ūdeņraža peroksīdu (Morano et al. 2012). Viens no ROS produktiem ir superoksīdu radikāļi, kas var inaktivēt proteīnus – katalāzi un dehidratāzi. Katalāze sadala ūdeņraža peroksīdu par ūdeni un skābekli. Raugiem esošie superoksīda radikāļa detoksikācijas mehānismi, kā arī superoksīda dismutāze ir svarīgi izdzīvošanai. Superoksīdu radikāļi ir iesaistīti arī kā signālmolekulas raugu novecošanas procesos (Lewinska et al. 2011). ROS var izraisīt disfunkciju proteīnu sintēzē, kā rezultātā tiek traucēta mRNS translācija (Cecarini et al. 2007), kā arī ROS ietekmē citoskeleta aktīnu, kas izraisa paātrinātu novecošanu un apoptozi (Farah and Amberg, 2007). Liela daļa mitohondriālo trikarbonskābju cikla proteīnus viegli var bojāt ar ūdeņraža peroksīdu un superoksīda radikāļiem (Cecarini et al. 2007).



2. attēls. *S. cerevisiae* šūnu atbildes uz oksidatīvo stresu (ar izmaiņām no Farrugia & Balzan 2012)
 Figure 2. Cellular responses to oxidative stress in *S. cerevisiae* (with changes from Farrugia & Balzan 2012)

Oksidatīvais stress izraisa arī nukleīnskābju bojājumus, kas iekļauj vienpavediena vai divpavediena DNS sasīelšanu (Finn et al. 2012), hromosomu fragmentāciju (Ribeiro et al. 2006), notiek lipīdu peroksidācija, kas ir autokatalītisks process, ko izraisa polinepiesātināto taukskābju oksidācija (Farrugia and Balzan 2012).

Ūdenraža peroksīda signalizēšana aktivē transkripcijas faktoros, kas regulē antioksidantu gēnu ekspresiju raugos (Farrugia and Balzan 2012). Karstuma šoka atbildes reakcijas antioksidanti-katalāze, glutaredoksīni, peroksiredoksīni, superoksīdu dismutāzes, tioredoksīni- palielina ekspresiju un pretojas karstuma izraisītam oksidatīvajam stresam (Causton et al. 2001, Albrecht et al. 2010 cit. pēc. Shui et al. 2015).

Oksidatīvā stresa rezultātā rauga NAPD dehidrogenāze Ndi1p, kas atrodas iekšējā mitondriju membrānā (Li et al., 2006) un ROS akumulācija izraisa apoptozi jeb programmēto šūnu nāvi, kā arī nekrozi (Farrugia and Balzan 2012).

Viena no raugam svarīgām antioksidantu sistēmām, kas tiek izmantota pret oksidatīvo stresu, ir glutaciona sistēma. Glutacionis ir tripeptīds, kas sastāv no L-glutamāta, L-cisteīna un glicīna, kas ir atrodams mazās k koncentrācijās šūnās. Oksidatīvais stress pārvērš divas glutaciona molekulas tā oksidētā disulfīdu formā (Couto et al. 2016) Glutaciona reduktāze Glr1 ir no NADPH atkarīga oksireduktāze, kā dēļ glutacionis atrodas reducētā formā (Morano et al. 2012). Glutaciona reduktāze ir nepieciešama izdzīvošanai oksidatīvo stresu apstākļos. Tas tiek sintezēts citosolā un transportēts uz mitohondriju (Gostimskaya and Grant 2016). Glutacionis kalpo kā elektronu donors/kofaktors antioksidantu enzīmiem, kā glutaciona peroksidāzes, glutaciona s-transferāzes un glikoksalāze (Couto et al. 2016).

1.5.2. Karstuma stress

Visbiežākais stress, ar ko saskaras rauga šūnas, ir apkārtējā temperatūras maiņa. *S. cerevisiae* optimālā augšanas temperatūra ir starp +25°C un +30°C, savukārt pat pie salīdzinoši nedaudz augstākas temperatūras (+36-37°C) rauga šūnas jau aktivizē karstuma šoka atbildes reakcijas. Raugi saglabā augšanu temperatūrā līdz +42°C, bet nespēj tikt galā ar ilgstošu pakļaušanu šādam karstumam (Yamamoto et al. 2005). Raugi var sasniegt termotoleranci noteiktā temperatūrā, kas saistīts ar karstuma šoka faktoriem un stresa atbildes reakciju ceļiem (Parsell et al. 1994). Rauga šūnas var iegūt nelielu toleranci arī tad, ja tās ir pakļautas lēnai sildīšanai (0,5°C/min) (Guyot et al. 2005). Stresa atbildes reakciju ceļi regulē karstuma šoka proteīnus (Hsp), kas veido termotoleranci (Lindquist& Kim, 1996).

Viens no mehānismiem, kas izraisa karstuma šoka atbildes reakcijas, ir *MSN2* un *MSN4* gēni (Thevelein et al. 2000). *MSN2/4* regulē gēnu transkripciju, kas regulē trehalozes metabolismu, kam ir svarīga nozīme termotolerancē. Tas nozīmē, ka trehalozes daudzums, kas ir atkarīgs no *MSN2/4*, ietekmē šūnu izdzīvotību pēc pakļaušanas karstuma stresam. Arī karstuma šoka transkripcijas faktoru aktivitāti regulē trehaloze (Yamamoto et al. 2008).

Pēc karstuma šoka šūnas samazina vispārējo proteīnu sintēzi, lai fokusētos uz karstuma šoka proteīnu sintēzi, kas ir nepieciešams šūnu atjaunošanai un izdzīvošanai. Lai šūnas izdzīvotu, proteīni pilda daudz funkciju- šūnu sienīgu atjaunošana, ar ubikvitīnu saistītu proteīnu degradācija, DNS un RNS modificējoši enzīmi, metabolie enzīmi, regulatorie proteīni un citi- kas saistīti ar šūnu struktūras uzturēšanu (Richter et al. 2010).

W. Xiao un kolēģi (Xiao et al. 2018) izpētīja *S. cerevisiae* W303 celma reakciju uz karstuma šoku, paaugstināti ekspresējot 93 proteīnus, kas iesaistīti ogļhidrātu metabolismā, proteīnu foldingā, transporta un organellu organizācijā un oksidatīvā stresa reakcijā. Tika izpētīts, ka dažādiem vielmaiņas enzīmiem, kas iesaistīti glikolīzē, pentozes fosfāta ceļā un saharozes metabolismā ir palielināta enzīmu ekspresija īslaicīgā karstuma šokā.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Iekārtas un materiāli

2.1.1 Iekārtas

1. tabula

Izmantotās iekārtas.

Table 1

Equipment used in research.

Iekārtas Equipment	Ražotājs Producer	Valsts State
Laminārs FlowFast	FASTER S.r.l.	Itālija
Plašu lasītājs Infinite M200 PRO	Tecan	Austrija
Centrifūga 5810R	Eppendorf	Vācija
Spektrofotometrs HALO VIS-20	Dynamica	Šveice
Autoklāvs	CertoClav	Austrija
Centrifūga Sigma 1-16	Sigma	Vācija
Termobloks TDB-120	Biosan	Latvija
Kratītājs-inkubators ES-20	Biosan	Latvija
Kratītājs-inkubators I26	Eppendorf	Kanāda
Vienkanāla pipetes: 0.5-10μ; 10-200μ;200-1000μ; 0,5mL-5mL	Eppendorf	Vācija
Daudzkanālu pipetes:0,5- 10μ;10-100μ; 30-300μ;	Eppendorf	Vācija
Analītiskie svāri ABJ 120- 4NM	Kern	Vācija
Maisītājs Bio Vortex V1	Biosan	Latvija

2.1.2 Reaģenti

2. tabula

Izmantotie reaģenti.

Table 2

Used reagents.

Reaģenti Reagents	Ražotājs Producer	Valsts State
Adenīna hemisulfāts	Sigma-Aldrich	Vācija
Tetraciklīns	Sigma-Aldrich	ASV
Amonija sulfāts	Sigma-Aldrich	Vācija
D-Glikozes monohidrāts	Sigma-Aldrich	Vācija
Ūdeņraža peroksīds	Sigma-Aldrich	Vācija
Joda nitrotetrazolija hlorīds (INT)	BioChemika	Austrija
3,3',5,5'tetrametilbenzidīns (TMB)	BioChemika	Austrija
Nātrija karbonāts	Sigma-Aldrich	Vācija
Rauga ekstrakts	Biolife	Itālija
Bakterioloģiskais peptons	Biolife	Itālija
Agars	Biolife	Itālija
Fenazīna metosulfāts (PMS)	Sigma-Aldrich	Vācija
Digitonīns	Sigma-Aldrich	Vācija
Joda nitrotetrazolija hlorīds (INT)	Sigma-Aldrich	Vācija
Glikozes 6-fosfāts	Roche	ASV
NADP+	Roche	ASV
Tris-hidrohlorīda buferšķīdums (TRIS-HCL, pH=8,8)	Sigma-Aldrich	Vācija
Fosfāta buferšķīdums (IKP, pH=7)	Sigma-Aldrich	Vācija
Kalcija hlorīds	Sigma-Aldrich	Vācija
Nātrija hlorīds	Sigma-Aldrich	Vācija
Magnija sulfāts	Sigma-Aldrich	Vācija

2.2. Izmantotie raugu celmi

Visi rauga celmi celmi uzglabāti 0,9% NaCl, 15% glicerīnā -80°C temperatūrā un pirms lietošanas maizes rauga celms izsēts uz agarizētām YPD platēm, kas uzglabātas 4°C. Viena kultūra uz plates netika uz plates uzglabāta ilgāk par 3 mēnešiem, kā arī netika pārsēta no 4 °C vairāk kā piecas reizes.

4. tabula

Izmanotie *S. cerevisiae* celmi.

Table 4

S. cerevisiae strains used in this research.

Celma numurs LU MBI kolekcijā Strain number in collection of LU MBI	Celma nosaukums pētījumā	Genotips Genotype	Avots Source
Y139	W303	<i>MATa</i>	Dāvana no Frederick R. Cross
Y237	$\Delta ade2$	<i>MATa</i> <i>ade2::kanMX4</i>	LU MBI kolekcija
Y235	$\Delta ade4$	<i>MATa</i> <i>ade4::kanMX4</i>	LU MBI kolekcija
Y238	$\Delta ade8$	<i>MATa</i> <i>ade8::kanMX4</i>	LU MBI kolekcija

2.3. Izmantotās barotnes

YPD jeb YEPD agara plašu barotnes sastāvs (no J. Dymond 2013): glikoze (20 g·L⁻¹), rauga ekstrakts (10 g·L⁻¹), peptons (20 g·L⁻¹), agars (20 g·L⁻¹), tetraciklīns (25 mg·L⁻¹).

Šķidrās barotnes sastāvs (no Dunham&Mitchell 2010):

- CaCl₂·2H₂O (0,1 g·L⁻¹);
- NaCl (0,1 g·L⁻¹);
- MgSO₄·7H₂O (0,5 g·L⁻¹);
- KH₂PO₄ (1 g·L⁻¹);
- (NH₄)₂SO₄ (5 g·L⁻¹);
- glikoze (20 g·L⁻¹);
- 1000x sāļu maisījums (1 ml·L⁻¹);

- 1000x vitamīnu maisījums ($1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$);
- adenīns ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

1000 reižu koncentrācijā sagatavotais sāļu maisījuma sastāvs:

- borskābe ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- KI ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Sāļu maisījumu uzglabā ledusskapī tumšā pudelē.

1000 reižu koncentrācijā sagatavotais vitamīnu maisījuma sastāvs:

- biotīns ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$ ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- folijskābe ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- inositols ($2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- niacīns ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- p-aminobenzoskābe ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- piridoksīna HCl ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- riboflavīns ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
- tiamīna HCl ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Vitamīnu maisījumu uzglabā saldētāvā.

Sintētisko barotni bez slāpekļa avota pagatavo bez pievienota amonija sulfāta. Adenīna biosintēzes ceļa mutāciju celmiem barotnēs papildus pievieno adenīnu ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) atsevišķi kolbās. Arī atsevišķi sagatavo 20% glikozi, ko pievieno kolbā kopā ar sintētisko barotni vai YPD agarizētai barotnei tikko no autoklāva. Glikoze jāpievieno 10% no kopējā tilpuma.

Visas barotnes tika gatavotas destilētā ūdenī un sterilizētas autoklāvā 121°C 15 minūtes. Barotnēm pēc autoklāvēšanas pievieno antibiotiku- tetraciklīnu.

2.4. Rauga kultivēšana

No YPD plates paņem ar mikrobioloģisko cilpu vienu maizes rauga *S. cerevisiae* koloniju, ko ienes 5 ml pilnajā sintētiskajā barotnē, lai šūnām nodrošinātu ģenētisko vienveidību un lai

nākamajā dienā varētu inokulēt log fāzes šūnu kultūras. Šo sauc par naktskultūru. Mēģenes ievieto inkubatorā-kratītājā, kur šūnas audzē 30°C temperatūrā un uz 180 rpm aptuveni diennakti.

Nākamajā dienā nomēra naktskultūru optisko blīvumu OD₆₀₀ trijos atkārtojumos. No naktskultūras paņem tik daudz šūnu kultūru, lai uz eksperimenta sākumu nākamajā dienā pēc aptuveni 15-20 stundām sasniegtu izvēlēto optisko blīvumu, piemēram, OD₆₀₀=1, kas atbilstu straujas šūnu augšanas fāzei.

Pēc aptuveni 15-20 stundām nomēra šūnu kultūrām optisko blīvumu un izvēlas to, kura optiskais blīvums ir tuvāk izvēlētajam. Šūnas mazgā divas reizes, ielejot destilētu ūdeni stobriņos ar šūnām un liekot centrifūgā uz 8700 apgriezieniem minūtē trīs minūtes. Pēc mazgāšanas šūnu kultūras salej kolbās. Vienam celmam ir trīs kolbas- kolba ar visām nepieciešamajām barības vielām jeb kolba ar pilno barotni, otrā kolba bez pievienota amonija sulfāta un trešā kolba bez pievienota adenīna.

Visas kolbas inkubē četras stundas inkubatorā-kratītājā 30°C temperatūrā un 180rpm. Celmi audzēti kolbās, barotnei neaizņemot vairāk kā piekto daļu trauka tilpuma.

2.5. Augšanas dinamika

Rauga augšanas dinamikas noskaidrošanai izmantots Tecan plašu lasītājs. Šūnas tika kultivētas pilnajā barotnē ar visām nepieciešamajām barības vielām, bez adenīna, slāpekļa avota jeb amonija sulfāta un oglekļa avota jeb glikozes.

Kultivēšana notika 96 lauciņu platē 30°C temperatūrā ar ciklu: orbitālā kratīšana 3,5 mm, amplitūda 490 sekundes, gaidīšana 60 sekundes. Absorbcijas mērījums pie OD₆₀₀.

Šūnu kultūras dubultošanās laiks un specifiskais augšanas ātrums tiek aprēķināts, izmantojot naturāllogaritmu un zinot sākuma un beigu OD eksponenciālajā fāzē jeb noteiktā laika intervālā. Šūnu kultūras dubultošanās laiku aprēķina, izmantojot formulu:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \ln(2^n) \text{ jeb } \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = 0,693\left(\frac{t}{t_d}\right), \text{ kur}$$

t- augšanas laiks, h;

t_d- dubultošanās laiks, h;

X- beigu OD₆₀₀;

X₀- sākuma OD₆₀₀.

Savukārt specifisko augšanas ātrumu aprēķina, izmantojot to pašo formulu, pārveidojot uz: $\mu = 0,693/t_d$, kur 0,693 iegūts no $\ln(2^n)$.

2.6. Celmu subletālā izdzīvotības noteikšana

Izmantotas divas subletālo stresu izturības pārbaudes- karstuma stress un oksidatīvais stress. Pētījums veikts pēc M. Klosinska un kolēģu (Klosinska et al. 2011) aprakstītām metodēm, pārbaudot šūnu izdzīvotību badinātiem un nebadinātiem raugu celmiem.

Gan karstuma, gan oksidatīvajam stresam pakļautas četras stundas badinātas un nebadinātas šūnu kultūras. Rauga šūnu kultūras tika iegūtas pēc 2.4. nodaļā aprakstītajām metodēm.

Pirms stresu pakļaušanas katrai kolbai nomērīts OD_{600} trijos atkārtojumos un katrs paraugs mazgāts divas reizes ar destilēto ūdeni, lai stobriņos paliktu tikai rauga šūnas. Pēc tam atšķaidīts ar destilēto ūdeni tā, lai no katras kolbas viena celma veidotos trīs šūnu paraugi ar izvēlēto optisko blīvumu, piemēram, $OD_{600}=2$ uz 1 mL katram paraugam.

Karstuma stresa gadījumā paraugi tika inkubēti termoblokā septiņas minūtes 50°C temperatūrā, savukārt oksidatīvā stresa gadījumā 1 mL šūnām pievienotas 10 μL 1M ūdeņraža peroksīda, kā rezultātā stobriņos veidojas 10 mM ūdeņraža peroksīda gala koncentrācija. Šūnas tika inkubētas 20 minūtes istabas temperatūrā. Pēc 20 minūtēm šūnas divas reizes mazgātas ar destilētu ūdeni un reuspendētas ar 1 mL destilētu ūdeni.

Pēc šūnu pakļaušanas stresam 96 lauciņu platēs veikti četri desmitkārtīgi seriālie atšķaidījumi, pēc tam uz YPD platēm uzsēti četri atšķaidījumi no katra parauga trijos atkārtojumos. Plates tika inkubētas aptuveni diennakti 30°C temperatūrā. Pēc diennakts saskaitītas kolonijas, izdzīvotība iegūta, aprēķinot izdzīvojušo šūnu skaitu uz mililitru kultūras.

2.7. Enzīmu aktivitātes mērījumi

Veikti divi enzīmu aktivitātes mērījumi- katalāzes un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes. Visiem celmiem sagatavotas 60 mL strauji augošas šūnas un tās tika badinātas tā, kā aprakstīts 2.4. nodaļā. Pēc četrus stundu inkubācijas laika šūnas divas reizes mazgātas ar destilētu ūdeni. Pēc mazgāšanas šūnām pievienots 0,5 mL digitonīna šķīdums un 0,5 mL IKP buferšķīdums uz 10 minūtēm, lai sagatavotu šūnas enzīmu reakcijām. Pēc 10 minūtēm šūnas atkal mazgātas divas reizes un reuspendētas tā, lai būtu $OD_{600}=20$ katalāzes, bet glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzei $OD_{600}=2$.

Šūnu absorbcijas mērījumi veikti ar Tecan mikroplašu lasītāju 96 lauciņu platēs.

2.7.1. Glikozes 6-fosfāta dehidrogēnaze

Tika pagatavots reakcijas maisījums: 10 mL reakcijas maisījuma pagatavošana- 200 μL INT, 100 μL PMS, 30 μL glikozes 6-fosfāts, 20 μL NADP+ un 9,5 ml 0,2 M TRIS-HCL (Vangravs 2017). No katras kolbas raugam celmam četros atkārtojumos lauciņam pievienots 150 μL reakcijas

maisījums un 30µL šūnu biomasas. Plate ievietota Tecan plašu lasītājā un ar injektoriem pievienots 20 µL 40mM glikozes 6-fosfāts un 20 µL NADP+.

Absorbcija mērīta ar ciklu orbitālā kratīšana 2,5 mm, amplitūda piecas sekundes, absorbcijas mērījums pie OD₅₉₅ ik pēc 40 sekundēm aptuveni 20 ciklu mērījumi. Ja reakcija notiek, veidojas rozā krāsa.

2.7.2. Katalāze

Katalāzes reakcijai sagatavots 0,1 M IKP buferšķīdums un 0,5 M ūdeņraža peroksīds. Četros atkārtojumos no katra rauga celma kolbas katram lauciņam pievienots 150 µL buferšķīdums un 30 µl šūnu biomasas. Ar Tecan injektoru pievienots 20 µL 0,5 M ūdeņraža peroksīds.

Absorbcija tika mērīta pie OD₂₄₀ ar laika intervālu 20 sekundes aptuveni 20 ciklus.

2.8. Izmantotās statistiskās metodes

Izmantojot RStudio 3.6.2. pieejamo Šapiro testu starp viena celma pilnajām barotnē audzētām šūnām un adenīna avota badinātām vai slāpekļa avota badinātām rauga šūnām, noskaidrota datu atbilstība normālsadalījumam. Izmantojot t-testu vai Wilcoxon testu, pārbaudīts, vai pastāv būtiska atšķirība starp datiem jeb $p \leq 0,05$, kas grafikos ir iezīmētas ar zvaigznīti.

Standartnovirzes aprēķinātas ar STDEV.S funkciju, izmantojot MS Excel 365. Izdzīvotība noteikta, dalot izdzīvojušās stresa pakļautas šūnas mililitrā uz OD vienību ar badinātām šūnām, kas nav pakļautas stresam.

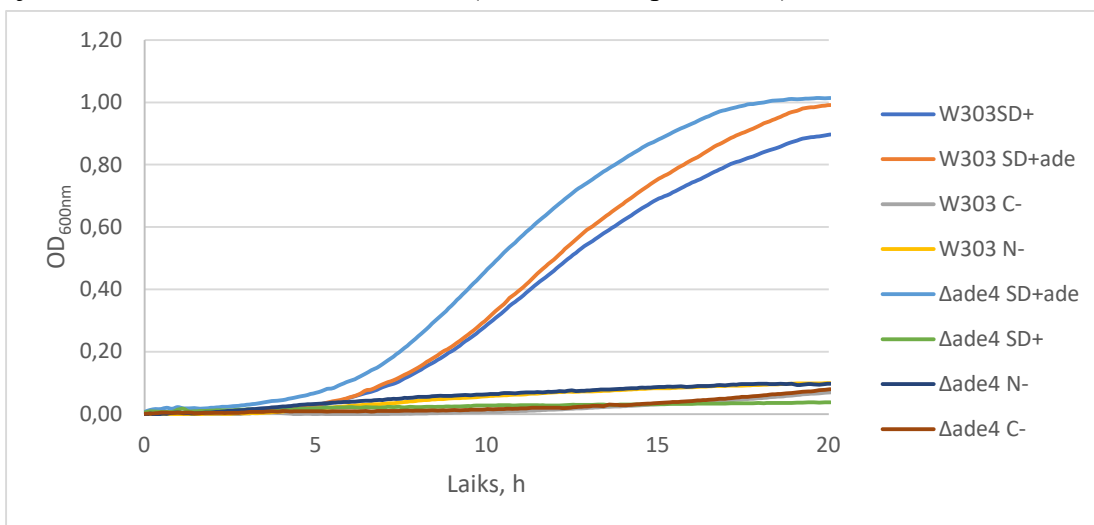
3. REZULTĀTI

Bakalaura darba ietvaros noskaidrota badināšanas ietekme uz šūnu augšanas dinamiku, nepievienojot noteiktas barības vielas, lai noskaidrotu, kā aug rauga šūnas, kuras audzētas konkrētā barotnē. Tika pētīta šūnu izturība pēc pakļaušanas iepriekš noskaidrota, optimāla ilguma oksidatīvajam vai karstuma stresam šūnām pēc četrus stundu kultivēšanas barotnēs bez slāpekļa vai adenīna avota un pilnajā barotnē. Lai gūtu pilnīgāku priekšstatu par šūnās notiekošajiem procesiem, papildus veiktas divas enzīmu reakcijas - katalāze un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāze četras stundas audzētām badinātām un nebadinātām šūnām, lai salīdzinātu šos rezultātus ar iegūto oksidatīvā stresa subletālo izdzīvotību un, iespējams, novērotu tendences.

3.2. Badināšanas ietekme uz šūnu augšanas dinamiku

Vispirms ar Tecan mikroplašu lasītāju tika noskaidrota visu šajā darbā izmantoto raugu celmu augšanas dinamika pilnajā barotnē un barotnēs bez pievienotiem barības vielu avotiem, lai novērtētu augšanu badinātos un nebadinātos apstākļos. Šūnas kultivētas 96 lauciņu platēs ar sākuma $OD_{600}=0,05$. Attēlotie dati ir vidējie rādītāji no četriem atkārtojumiem katram paraugam.

Prototrofam celmam W303 (skat. 3.att.) ir novērojama līdzība augšanas līknēs pilnajā barotnē ar papildus pievienotu adenīnu un nepievienotu adenīnu. Prototrofs spēj sintezēt sev nepieciešamo vielu, šajā gadījumā adenīnu, tāpēc nav nepieciešams pievienot adenīna avotu. Adenīna mutantais celms $\Delta ade4$ (skat. 3.att.) nespēj augt, ja papildus barotnei nav pievienots adenīns. Šāda tendence novērojama arī $\Delta ade2$ un $\Delta ade8$ celmiem (skat. 1. un 2. pielikumu).



3. attēls. W303 un $\Delta ade4$ celma augšanas līknes dažādās barotnēs, SD+ pilna barotne bez adenīna; SD+ade pilna barotne ar adenīna avotu; C- pilna barotne bez glikozes, N- pilna barotne bez amonija sulfāta.

Figure 3. W303 and $\Delta ade8$ strain growth curves, cultivated in different medias, SD + complete medium without adenine; SD +ade complete medium with adenine source; C- complete medium without glucose, N- complete medium ammonium sulphate.

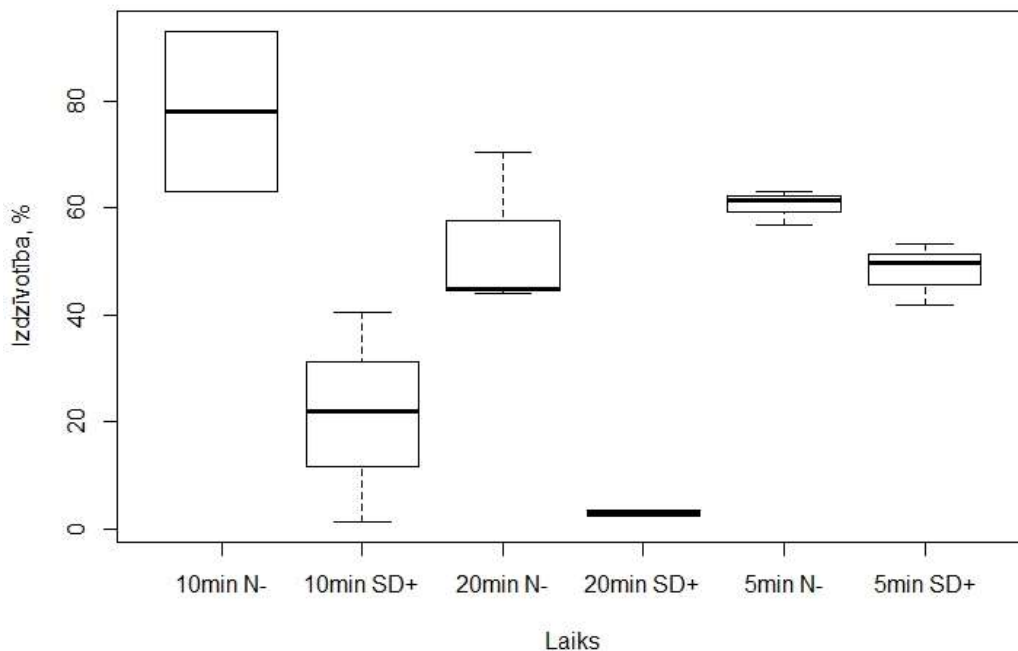
Visiem celmiem, tai skaitā prototrofam, nav novērojama izteikta šūnu augšana, ja barotnē nav pievienots oglekļa un slāpekļa avots, kas izraisa dabisko barības vielu limitāciju.

Prototrofam dalīšanas laiks ir tāds pats gan pilnajā barotnē bez adenīna avota, gan ar adenīna avotu. Šūnu dubultošanas laiki ievērojami neatšķiras savā starpā starp adenīna mutantiem (skat. 3. pielikumu). Celmam $\Delta ade8$ (skat. 2. pielikumu) novēro eksponenciālo augšanas fāzi vēlāk nekā pārējiem celmiem, jo šūnas kultivēšanas dienā atradās lag fāzē, taču var novēro šūnu augšanu pilnajā barotnē ar pievienotu adenīnu.

3.3. Stresa apstākļu optimizācija

Tika noskaidrots optimālais stresa pakļaušanas laiks izejas celmam W303 gan karstuma, gan oksidatīvajam stresam.

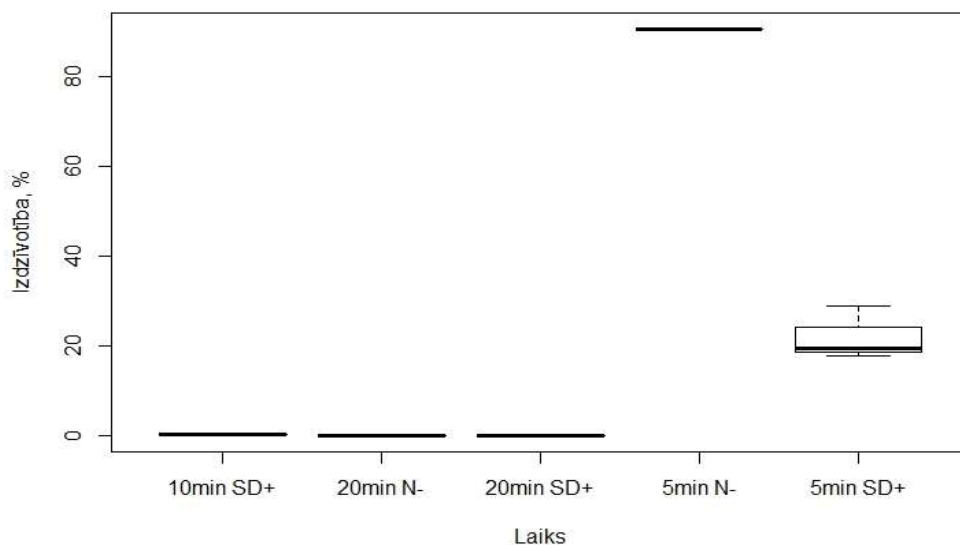
Karstuma un oksidatīvajam stresam pakļautas izejas celma W303 šūnas, kas pirms tam četras stundas kultivētas kolbās barotnē bez slāpekļa avota (apzīmēts ar N-) un pilnajā barotnē (SD+). Šūnas stresam pakļautas noteiktos laika ilgumos- 5 minūtes, 10 minūtes un 20 minūtes 50°C temperatūrā vai 10 mM ūdeņraža peroksīda k koncentrācijā, lai noskaidrotu optimālo stresa pakļaušanas ilgumu. Kā optimāls ilgums izvēlēts tāds, kurā šūnu izdzīvotība pilnajā barotnē ir starp 1% un 10%. Šūnas tika uzsētas uz agarizētajām platēm četros desmitkārtīgos atšķaidījumos, katram bija paraugam trīs atkārtojumi. Pēc diennakts inkubēšanas 30°C izdzīvojušās šūnas tika saskaitītas. Pēc stresa izdzīvojušais šūnu skaits mililitrā uz OD₆₀₀ tika dalīts ar šūnu skaitu, kas atbilst konkrētam celmam konkrētā barotnē audzētām šūnām, lai iegūtu izdzīvotību procentos (skat. 4. pielikumu).



4.attēls. Četru stundu kultivēta W303 celma izdzīvotība pilnajā barotnē SD+ un bez slāpekļa avota N- pēc oksidatīvā stresa, pakļaujot šūnas 10mM H₂O₂ koncentrācijai atšķirīgus laika periodus.

Figure 4. Survival of a four-hour cultured W303 strain in complete medium SD+ and without nitrogen source N- after oxidative stress exposure at different times in 10 mM H₂O₂ concentration.

Oksidatīvajam stresam (skat. 4.att.) ir novērojams liels skaits izdzīvojošo šūnu 5 minūšu un 10 minūšu stresam gan pilnajās barotnēs, gan barotnēs bez slāpekļa avota. Barotnē N- kultivētām šūnām izdzīvotība ir aptuveni 50% pēc 20 minūšu stresa pakļaušanas, savukārt pilnajā barotnē izdzīvotība ir zem 10%. Optimālais šūnu pakļaušanas laiks ir 20 minūtes oksidatīvajam stresam, jo ir novērojama ievērojama šūnu izdzīvotības samazināšana.



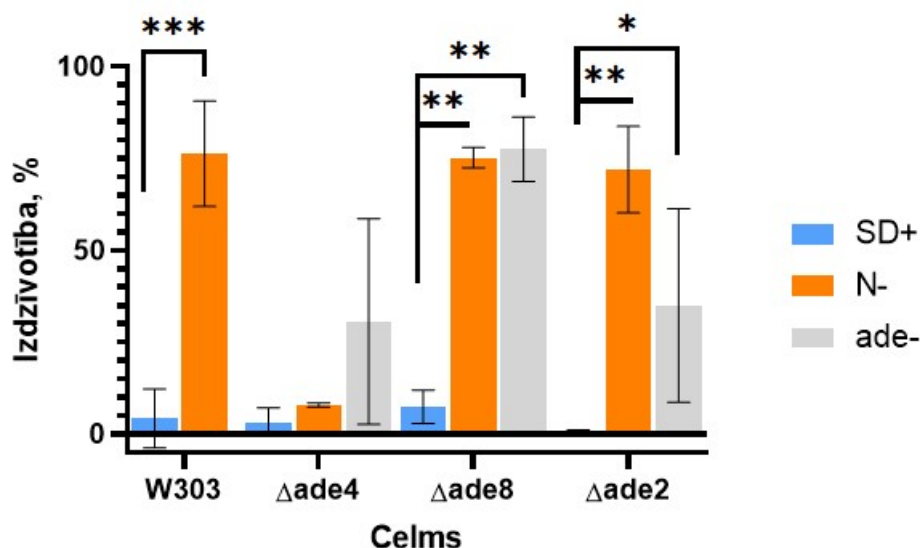
5.attēls. Četrus stundus kultivēta W303 celma izdzīvotība pilnajā barotnē SD+ un bez slāpekļa avota N- pēc karstuma stresa pakļaujot dažādos laikos 50°C temperatūrā.

Figure 5. Survival of a four-hour cultured W303 strain in complete medium SD+ and without nitrogen source N- after heat stress at different times at 50°C.

Pēc karstuma stresa pakļaušanas vislabākā izdzīvotība (skat. 5.att) ir novērojama pēc pakļaušanas stresam piecas minūtes šūnām, kas audzētas gan SD+, gan N- barotnē, bet pēc 10 minūtēm ir novērojams mazs šūnu skaits, savukārt pēc 20 minūšu karstuma stresa pakļaušanas netika novērotas rauga šūnas. Karstuma stresam kā optimālie izvēlēti tādi apstākļi, kuros izdzīvotība strauji augošām šūnām ir zem 10% jeb šajā gadījumā ir izvēlēta 5 minūšu pakļaušana karstuma stresam, kā dēļ šūnu izdzīvotība provizoriski ir starp 1% un 10%.

3.4. Adenīna biosintēzes ietekme uz karstuma stresa izturību

Raugu celmi W303, $\Delta ade2$, $\Delta ade4$, $\Delta ade8$ pakļauti 50°C septiņās minūtes. Stresam pakļautas četrus stundus kultivētas šūnas, kas audzētās dažādās barotnēs. Barotne ar apzīmējumu SD+ nozīmē, ka raugam ir visas nepieciešamās vielas, tai skaitā adenīna biosintēzes ceļa mutāciju celmiem pievienots adenīns, savukārt ade- nozīmē, ka ir viss, izņemot adenīna avotu adenīna biosintēzes ceļa mutantiem. Prototrofam pilnā barotne SD+ sastāv bez adenīna.



6. attēls. Darbā izmantoto raugu celmu izdzīvotība dažādās barotnēs 50°C temperatūrā 7 minūtes: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***.

Figure 6. Survival of yeast strains used in the work in different media at 50 ° C for 7 minutes: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***.

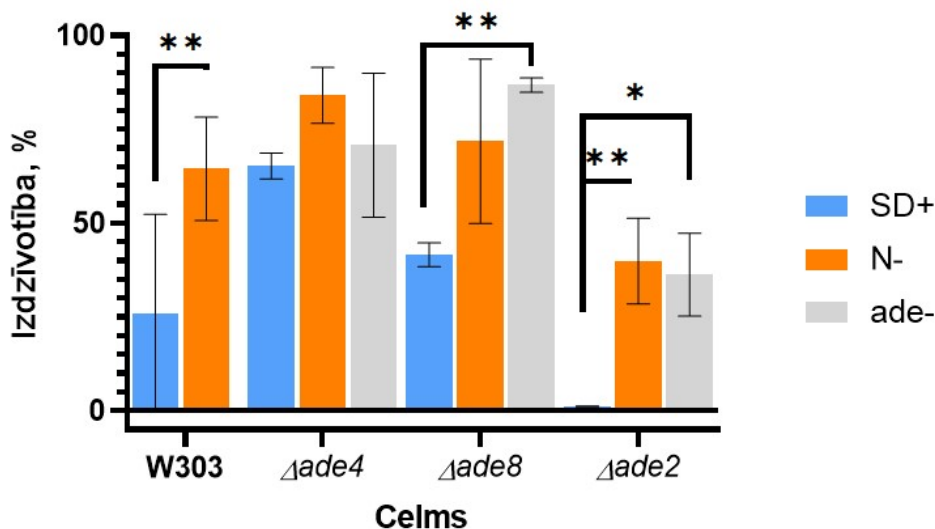
Visiem celmiem, kuri audzēti pilnajā barotnē (SD+) novēro kopīgu tendenci jeb visiem celmiem, kas kultivēti SD+ barotnē (skat. 6.att), šūnām ir vismazākā izdzīvotība. Izejas celmam SD+ barotnē audzētas šūnas būtiski atšķiras ($p \leq 0,05$) no slāpekļa audzētām šūnām, tāpat to novēro arī $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$ celmiem, kur būtisku atšķirību izdzīvotībā novēro starp SD+ un ade- barotnē audzētām šūnām. Celmam $\Delta ade2$ SD+ barotnē izdzīvotība sasniedz 0,57%, kas ir tuvu nullei. Tas ir viszemākais rādītājs. Savukārt būtiski neatšķiras izdzīvotība $\Delta ade4$ celmam starp SD+ un N- barotnēm, SD+ un ade- barotnēm.

Celmiem W303, $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$ barotnē bez slāpekļa avota novēro līdzīgu izdzīvotību, bet vismazākā izdzīvotība bez slāpekļa avota ir $\Delta ade4$ celmam, kur izdzīvotība nepārsniedz 8%. Adenīna biosintēzes mutāciju ceļa celmiem $\Delta ade4$ un $\Delta ade8$, kas audzēti bez adenīna avota, novēro lielāku izdzīvotību nekā šūnām, kas izdzīvojušas SD+ un N- barotnē. Atšķirību novēro $\Delta ade2$ celmam, kur šūnas bez adenīna izdzīvo aptuveni divas reizes mazāk nekā barotnē bez slāpekļa avota.

Karstuma stresa izdzīvotībā iezīmējas kopīga tendence - augstāka stresa izturība ir badinātām šūnām, mazāka- pilna sastāva barotnē audzētām šūnām.

3.5. Adenīna biosintēzes ietekme uz oksidatīvā stresa izturību

Visas rauga šūnas pakļautas 20 minūtes ar 10 mM ūdeņraža peroksīda gala koncentrāciju.



7. attēls. Darbā izmantoto raugu celmu izdzīvotība dažādās barotnēs 10mM ūdeņraža peroksīda koncentrācijā temperatūrā 20 minūtes: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **.

Figure 7. Survival of yeast strains used in the work in different media at at 10 mM hydrogen peroxide concentration for 20 minutes: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***.

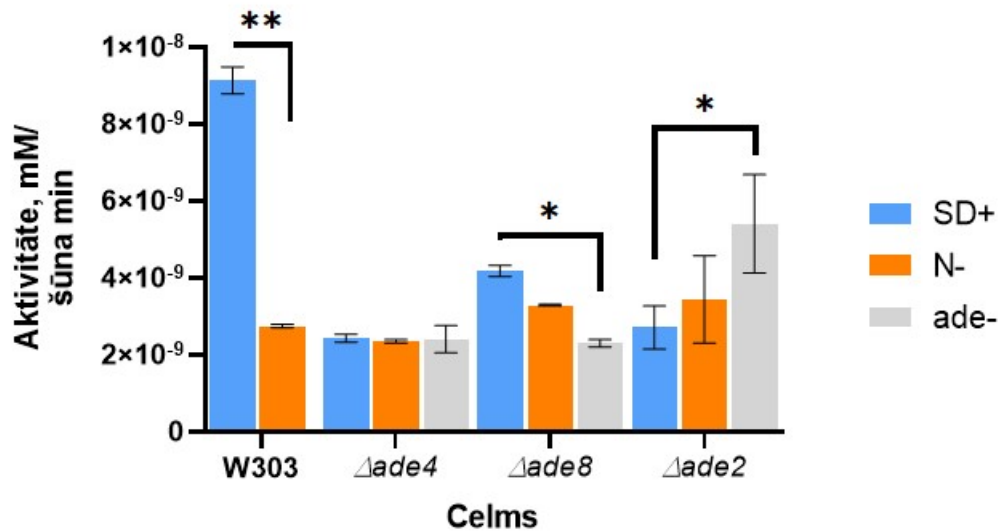
Būtiski atšķiras ($p \leq 0,05$) šūnu izdzīvotība, kas audzētas pilna sastāva barotnēs un barotnēs bez slāpekļa avota W303 un $\Delta ade2$ celmiem. Celmam $\Delta ade2$ izdzīvotība pilnajā barotnē ir 1,17%, kas būtiski atšķiras arī ar šūnām, kas audzētas bez adenīna avota. Celmiem $\Delta ade2$ un $\Delta ade8$, kas audzēti bez adenīna avota novēro būtisku atšķirību starp pilnajā barotnē audzētām šūnām. Celmam $\Delta ade4$ ir novērojama salīdzinoši līdzīga izdzīvotība visās barotnēs audzētām šūnām.

Visiem celmiem novēro kopīgu tendenci - mazāk izdzīvo tās šūnas, kas kultivētas pilna sastāva barotnēs. Celmiem, kas audzēti bez slāpekļa avota novēro lielāku izdzīvotību nekā adenīna badinātām šūnām; izņēmums ir $\Delta ade8$ celms, kur lielāka šūnu izdzīvotība ir adenīna avota badinātām šūnām.

3.6. Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte

Tika noskaidrota glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte jeb absorbcijas izmaiņa minūtē uz vienu šūnu, lai gūtu pilnīgāku priekšstatu par glutationa reduktāzi, kas ir nepieciešama oksidatīvā stresa izdzīvošanai. Aktivitāte mērīta četrus stundas kultivētām šūnām pilnajā barotnē, barotnē bez slāpekļa avota un barotnē bez adenīna avota. Lai tiktu pie iegūtā rezultāta, tika ņemts vērā formazāna specifiskais absorbcijas koeficients, kas ir reducējies no joda nitrotetrazolija hlorīda

(skat 6. pielikumu). Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte mērīta ar Tecan mikroplašu lasītāju un katram paraugam ir vismaz trīs atkārtējumi.



8. attēls. Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte mM uz vienu šūnu minūtē pilnajā, bez slāpekļa, bez adenīna barotnēs: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***.

Figure 8. Glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in mM per cell per minute in complete, without added nitrogen, without added adenine medias: : $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **.

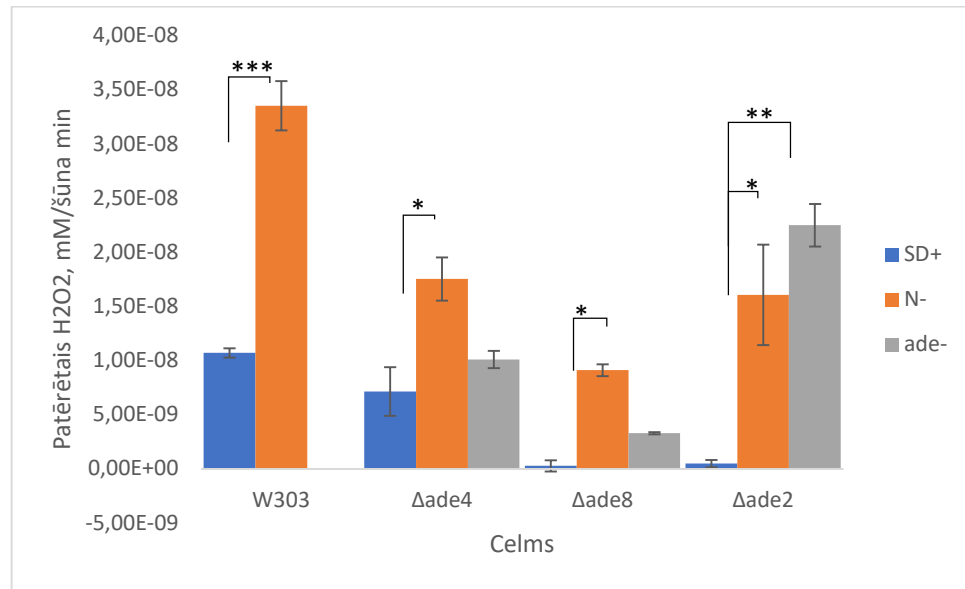
Izejas celmam W303 pilnajā barotnē novērojama būtiski lielāka aktivitāte nekā pārējiem celmiem visās barotnēs (skat. 8.att.). Tā būtiski atšķiras no šim celmam novērotās aktivitātes šūnām, kas kultivētas N- barotnē.

Līdzīgu glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāti novēro visās barotnēs $\Delta ade4$ celmam, tomēr nedaudz lielāka tā ir adenīna badinātām šūnām. Novērota pretēja aktivitātes tendence $\Delta ade8$ un $\Delta ade4$ celmiem. Abiem celmiem būtiski atšķiras aktivitāte starp SD+ un ade- barotni. Celmiem $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$ līdzīga aktivitāte N- barotnē audzētām šūnām, bet $\Delta ade2$ ir vislielākā aktivitāte ir ade- audzētām šūnām, savukārt $\Delta ade8$ pilnīgi pretēji- vismazākā glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte.

3.7. Katālāzes aktivitāte

Tika noskaidrots četru stundu badinātām un nebadinātām šūnām katalāzes aktivitātes patērētais H_2O_2 mM/minūtē uz šūnu. Katalāze sadala ūdeņraža peroksīdu par ūdeni un skābekli. Lai tiktu pie iegūtā rezultāta, tika noteikta OD_{240} atkarība no H_2O_2 koncentrācijas mikromolos, izmantojot slīpuma koeficientu (skat. 5. pielikumu). Katalāzes mērījumi veikti ar Tecan mikroplašu lasītāju un katram paraugam ir vismaz četri atkārtējumi.

Prototrofam W303 (skat. 9.att) ir novērojams būtiski lielāks patērētais H₂O₂ milimolos uz šūnu minūtē barotnē bez slāpekļa avota, kas arī ir visaugstākais rādītājs katalāzes mērījumiem. Visiem celmiem būtiski atšķiras patērētais H₂O₂ starp pilno barotni un barotni bez slāpekļa avota, $\Delta ade2$ būtiski atšķiras arī starp SD+ un ade- barotni. Līdzīga aktivitātes tendence ir $\Delta ade8$ un $\Delta ade4$ celmiem, kur lielāko aktivitāti novēro slāpekļa badinātām šūnām, otru lielāko aktivitāti - adenīna badinātām šūnām, savukārt $\Delta ade2$ vislielāko aktivitāti uzrāda adenīna badinātas šūnas.



9.attēls. Patērētais H₂O₂ mM uz šūnu minūtē bez slāpekļa, bez adenīna barotnēs:

$p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***.

Figure 9. Consumed H₂O₂ mM per cell per minute without added nitrogen, without added adenine medias. : $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***.

4. DISKUSIJA

Darba ietvaros iegūti dati par karstuma un oksidatīvā stresa izdzīvotību un divu enzīmu - katalāzes un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes- aktivitāti izejas celmam W303 un adenīna biosintēzes ceļa mutāciju celmos $\Delta ade4$, $\Delta ade8$ un $\Delta ade2$.

Darba ietvaros tika saskaitīts badinātu un nebadinātu šūnu skaits mililitrā uz OD₆₀₀ vienību (skat. 4. pielikumu), lai, aprēķinot izdzīvotību, nonāktu pie statistiski reāliem datiem. Literatūras dati norāda, ka rauga šūnu skaits uz OD₆₀₀=1 ir aptuveni $1 \cdot 10^7$ (Groves et al. 1996). Darbā iegūtais šūnu skaits katram celmam katrā barotnē atšķiras, tā atšķirību var radīt izmantotie optiskā blīvuma mēraparāti. Kokina et al. (2014) novēroja, ka adenīna auktrotrofo šūnu skaitu noteikšana, mērot optisko blīvumu, var būt neprecīza, kas ir saistīts ar adenīna biosintēzes ceļu mutantu šūnu izmēru palielināšanos pat tad, ja šūnu dalīšanās ir apstājusies. Atšķirību šūnu skaitā rada arī barošanas apstākļi.

Neatkarīgi no mutācijas visiem celmiem novēro kopīgu tendenci (skat. 6. un 7. att.)- šūnu izdzīvotība ir vismazākā visiem celmiem. Ir zināms, ka dabiski badinātos apstākļos šūnu izdzīvotība ir lielāka (Kłosinska et al. 2011). Tomēr izdzīvotība ir atkarīga no tā, kādas barības vielas trūkst. M. Petti un kolēģi (Petti et al. 2011) norāda, ka stresa izturība ir atkarīga no raugu celma auktrotrofijām. Par adenīna auktrotrofiem A. Kokina un kolēģi (Kokina et al. 2014) norāda, ka adenīna biosintēzes ceļa mutāciju celmam adenīna trūkuma gadījumā šūnas kļūst izturīgākas pret stresu un novēro augstāku izdzīvotību, taču tā ir zemāka nekā oglekļa badinātām šūnām. Tas tika novērots $\Delta ade2$ celmam. A. Kokina un kolēģi (Kokina et al. 2021) ir izvirzījuši hipotēzi, ka purīna auktrotrofija celmam ir līdzīga dabiski badinātām šūnām, kas ir slāpekļa vai oglekļa badinātas, ko novēroja $\Delta ade8$ celmam. Šajā darbā pēc stresa pakļaušanas iegūtie rezultāti par $\Delta ade8$ sakrīt ar literatūrā rakstīto. Novērots (skat. 6. un 7. att.), ka šim celmam ir salīdzinoši līdzīga izdzīvotība starp dabiski badinātām šūnām jeb bez slāpekļa avota un mākslīgi badinātām šūnām jeb bez adenīna (Kokina et al. 2021). Pakļaujot stresam $\Delta ade2$, novēro, ka augstāka stresa izturība ir dabiski badinātām šūnām jeb bez slāpekļa avota.

Lai pārbaudītu oksidatīvā stresa saistību ar enzīmu aktivitātēm, tika veikti katalāzes un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes mērījumi. Ir zināms, ka aerobi augošā šūnā galvenā skābekļa plūsma notiek caur elektronu transporta sistēmu, kas lokalizēta mitohondriju tīklā. Karstums izraisa oksidatīvo stresu, pārtraucot elektronu plūsmu caur elpošanas ķēdi. Paaugstināta jutība pret stresu tiek novērsta, ja notiek NADH dehidrogenāzes *NDE1* un *NDE2* gēnu delēcija, gēnu produkti ir

nepieciešamai elektronu pārnesei no NADH uz elpošanas ķēdi. Glutationa biosintēzes gēni *GSH1* un *GSH2* palīdz novērst siltuma izraisīto oksidatīvo stresu (Davidson and Schiestl 2001).

Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāze katalizē pirmo pentožu fosfāta ceļa posmu un ir NADPH avots, kā arī tas ir nozīmīgs aizsardzībai pret oksidatīvo stresu (Slekar et al. 1996). Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāze un to enzīmu aktivitāte ir aktīva oksidantu iedarbības laikā un līdz ar to ir nozīmīga oksidatīvā stresa atbildes reakcijai (Morano et al. 2012).

Izejas celmam (skat. 8. att) pilnajā barotnē glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte ir ievērojami lielāka nekā slāpekļa badinātu šūnu aktivitātei, savukārt adenīna mutanta celmam $\Delta ade4$ izdzīvotība visās barotnēs ir salīdzinoši līdzīga, tāpat salīdzinoši līdzīga ir enzīmu aktivitāte. Oksidatīvā stresa izdzīvotība šim celmam ir vislielākā, salīdzinot ar citiem adenīna mutantiem. Celmam $\Delta ade8$ novērojam tendenci- jo mazāka izdzīvotība, jo lielāka enzīmu aktivitāte, savukārt celmam $\Delta ade2$ šādu tendenci nenovēro. Šī celma oksidatīvā stresa izdzīvotība gan mākslīgi badinātām šūnām, gan dabiski badinātām šūnām ir līdzīga, bet lielāku glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāti novēro adenīna badinātām šūnām. Šajā darbā nav atrasta kopīga tendence starp oksidatīvā stresa izdzīvotību.

Glutationam ir nozīme ne tikai izdzīvotībai, bet arī šūnu augšanai. Tiek nodrošināta šūnu proliferācija un augšana (Pallardó et al. 2009). Prototrofam W303 netika klāt pievienots papildus adenīns, kas rada ievērojamu atšķirību glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitātei pilnajā barotnē, kas ir saistīts ar glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes katalizēšanu pirmajiem diviem soļiem pentožu fosfāta ceļam. Pentožu fosfāta ceļš ir svarīgs NADPH ražošanai. Pentožu fosfāta ceļš ir svarīgs, lai aizsargātu raugu no oksidatīvā stresa, jo NADPH ir būtisks glutaciona enzīmu kofaktors, kas aizsargā šūnas no oksidatīvajiem bojājumiem (Morano et al. 2012).

Karstuma stresa tolerance ir cieši saistīta ar aerobo metabolismu un oksidatīvo stresu. Šūnām ir paaugstināta jutība pret karstuma stresu, ja tām trūkst antioksidantu enzīmu, kā katalāzes un superoksīdu dismutāzes. Karstuma šoks ietekmē vairākus procesus, tai skaitā proteīnu stabilitāti (Morano et al. 2012).

Katalāze ir svarīgs enzīms, kas sadala ūdeņraža peroksīdu. Katalāze ir atkarīga no *Msn2/4* transkripcijas faktoriem, kas regulē stresa izturību atkarībā no barības vielu pieejamības (Morano et al. 2012). Tipiskai katalāzes atbildes reakcijai jābūt augstākai pie augstākas stresa izdzīvotības. Šo reakciju var novērot (skat. 9.att), kur prototrofam W303 būtiski atšķiras aktivitāte starp slāpekļa badinātām šūnām un nebadinātām šūnām, kā arī $\Delta ade4$ celmam. Tomēr ne visiem adenīna biosintēzes ceļa mutantiem šis ir novērojams. Celmam $\Delta ade2$ novēro augstāku katalāzes aktivitāti

adenīna badinātām šūnām, kaut gan izdzīvotība ir lielāka slāpekļa badinātām šūnām, savukārt $\Delta ade8$ novērojams pretējs efekts - mazāka katalāzes aktivitāte attiecībā pret izdzīvotību visās barotnēs. Var novērot vienotu tendenci - katalāzes aktivitāte ir zemāka tām šūnām, kas audzētas pilna sastāva barotnēs.

Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzei ir vairākas funkcijas, tādēļ šajā darbā nevar apgalvot saistību starp oksidatīvā stresa izdzīvotību un šo enzīmu aktivitāti. Lai to varētu noskaidrot precīzāk, būtu nepieciešams papildus mērīt glutaciona daudzumu. Katalāzes dati daļēji skaidro saistību starp oksidatīvā stresa izdzīvotību un katalāzes enzīmu aktivitāti, tomēr ne pilnīgi.

Šajā darbā ir pierādīts, ka neatkarīgi no adenīna biosintēzes mutācijas šūnām palielinās izturība pret karstumu un oksidatīvo stresu badinātos apstākļos.

5. SECINĀJUMI

1. Optimālais W303 prototrofa apstrādes ilgums karstuma stresam 50°C ir 7 minūtes, oksidatīvajam 10 mM H₂O₂- 20 minūtes;
2. Purīna un slāpekļa badināšana palielina karstuma un oksidatīvā stresa izturību neatkarīgi no mutācijas vietas adenīna sintēzes ceļā;
3. Adenīna sintēzes mutācija *Δade4* paaugstina šūnas oksidatīvā stresa izturību arī, ja šūnas kultivētas pilnajā barotnē;
4. Glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte nekorelē ar oksidatīvā stresa izturību. Lai novērtētu glutaciona sistēmas nozīmi uz oksidatīvā stresa izturību badināšanas laikā, būtu nepieciešams novērtēt reducētā glutaciona līmeni;
5. Katalāzes aktivitāte daļēji korelē ar oksidatīvā stresa izturību.

6. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību bakalaura darba vadītājai Zanei Ozoliņai par atsaucību, ieguldīto darbu un laiku, kā arī Jānim Liepiņam par palīdzību teorētiskajos un praktiskajos jautājumos.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

Alberghina L., Mavelli G., Drovandi G., Palumbo P., Pessina S., Tripodi F., Coccetti P., Vanoni M. 2012. Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein-protein interaction network. *Biotechnology Advances*, 30(1): 52–72.

Allen C., Büttner S., Aragon A.D., Thomas J.A., Meirelles O., Jaetao J.E., Benn D., Ruby S.W., Veenhuis M., Madeo F., Werner-Washburne M. 2006. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *Journal of Cell Biology*, 174(1): 89–100.

Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J., Gato G. *Biochemistry* (8th ed) W.H. Freeman and Company, 1232 pp.

Bharathi V., Girdhar A., Prasad A., Verma M., Taneja V., Patel B.K. 2016. Use of *ade1* and *ade2* mutations for development of a versatile red/white colour assay of amyloid-induced oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 33(12): 607–620.

Boer V.M., Amini S., Botstein D. 2008. Influence of genotype and nutrition on survival and metabolism of starving yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19): 6930–6935.

Broach J.R. 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192(1): 73–105.

Cecarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri A.M., Keller J.N. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(2): 93–104.

Chiu J., Tactacan C.M., Tan S.X., Lin R.C.Y., Wouters M.A., Dawes I.W. 2011. Cell cycle sensing of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidation of a specific cysteine residue in the transcription factor Swi6p. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7): 5204–5214.

Couto N., Wood J., Barber J. 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95 27–42.

Davidson J.F., Schiestl R.H. 2001. Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(24): 8483–8489.

Duina A.A., Miller M.E., Keeney J.B. 2014. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1): 33–48.

Dunham M., Mitchell E. 2010. *Dunham Lab Chemostat Manual*. <http://dunham.gs.washington.edu/chemostatv2.htm>.

- Dymond J.S. 2013. *Saccharomyces Cerevisiae Growth Media*. Methods in Enzymology 1st edn. Elsevier Inc., Vol. 533.
- Farah M.E., Amberg D.C. 2007. Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 18(4) 1359-65.
- Farrugia G., Balzan R. 2012. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*, 2 JUN(June): 1–21.
- Finn K., Lowndes N.F., Grenon M. 2012. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(9): 1447–1473.
- Gomes P., Sampaio-Marques B., Ludovico P., Rodrigues F., Leão C. 2007. Low auxotrophy-complementing amino acid concentrations reduce yeast chronological life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(5–6): 383–391.
- Gostimskaya I., Grant C.M. 2016. Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system. *Free Radical Biology and Medicine*, 94 55–65.
- Groves J.D., Falson P., Le Maire M., Tanner M.J.A. 1996. Functional cell surface expression of the anion transport domain of human red cell band 3 (AE1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22): 12245–12250.
- Guyot S., Ferret E., Gervais P. 2005. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(4): 403–409.
- Kim G., Sikder H., Singh K.K. 2002. A colony color method identifies the vulnerability of mitochondria to oxidative damage. *Mutagenesis*, 17(5): 375–381.
- Klosinska M.M., Crutchfield C.A., Bradley P.H., Rabinowitz J.D., Broach J.R. 2011. Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes and Development*, 25(4): 336–349.
- Kokina A., Kibilds J., Liepins J. 2014. Adenine auxotrophy - be aware: Some effects of adenine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* strain W303-1A. *FEMS Yeast Research*, 14(5): 697–707.
- Kokina A., Ozolina Z., Liepins J. 2019. Purine auxotrophy: Possible applications beyond genetic marker. *Yeast*, 36(11): 649–656.
- Kokina A., Tanilas K., Ozolina Z., Pleiko K., Svirks K., Vamza I., Liepins J. 2021. Global effects of *ade8* deletion on budding yeast metabolism, 1–24.

- Lewinska A., Macierzynska E., Grzelak A., Bartosz G. 2011. A genetic analysis of nitric oxide-mediated signaling during chronological aging in the yeast. *Biogerontology*, 12(4): 309–320.
- Li W., Sun L., Liang Q., Wang J., Mo W., Zhou B. 2006. Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4): 1802-1811.
- Lindquist S., Kim G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11): 5301–5306.
- Morano K.A., Grant C.M., Moye-Rowley W.S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4): 1157–1195.
- Neiman A.M. 2011. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189(3): 737–765.
- Pallardó F. V., Markovic J., García J.L., Viña J. 2009. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2): 77–85.
- Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.S., Hatziloukas E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications*. *AIMS Microbiology*, Vol. 6.
- Parsell D.A., Kowal A.S., A S.M., Lindquist S. 1994. Protein disassembly by heat-shock protein Hsp104. *Nature*.
- 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 of the United States of America*, 108(45):.
- Pronk J.T. 2002. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2095–2100.
- 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.
- Rébora K., Laloo B. & Daignan-Fornier, B. 2005. Revisiting purine-histidine crosspathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. - *Genetics*, 170(1), 61–70.
- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2): 253–266.

- Rolfes R.J. 2006. Regulation of purine nucleotide biosynthesis: In yeast and beyond. *Biochemical Society Transactions*, 34(5): 786–790.
- Saldanha A. J., Brauer M. J. & Botstein D. 2004. Nutritional Homeostasis in Batch and Steady-State Culture of Yeast. – *Molecular Biology of the Cell*, 15, 4089–4104.
- Santangelo G.M. 2006. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1): 253–282.
- Sherman F. 2002. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350(2002): 3–41.
- Shui W., Xiong Y., Xiao W., Qi X., Zhang Y., Lin Y., Guo Y., Zhang Z., Wang Q., Ma Y. 2015. Understanding the mechanism of thermotolerance distinct from heat shock response through proteomic analysis of industrial strains of *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(7): 1885–1897.
- Slekar K.H., Kosman D.J., Culotta V.C. 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46): 28831–28836.
- Smets B., Ghillebert R., De Snijder P., Binda M., Swinnen E., De Virgilio C., Winderickx J. 2010. *Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, Vol. 56.
- Thevelein J.M., Cauwenberg L., Colombo S., De Winde J.H., Donation M., Dumortier F., Kraakman L., Lemaire K., Ma P., Nauwelaers D., Rolland F., Teunissen A., Van Dijck P., Versele M., Wera S., Winderickx J. 2000. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9–10): 819–825.
- Urry L., Cain M., Wasserman S., Minorsky P., Reece J. *Campbell Biology*. (11th ed) Pearson, 1488pp.
- VanDusen W.J., Fu J., Bailey F.J., Burke C.J., Herber W.K., George H.A. 1997. Adenine quantitation in yeast extracts and fermentation media and its relationship to protein expression and cell growth in adenine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 13(1): 1–7.
- Walker G., Stewart G. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4): 30.

Wang L., Renault G., Garreau H., Jacquet M. 2004. Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 150(10): 3383–3391.

Xiao W., Duan X., Lin Y., Cao Q., Li S., Guo Y., Gan Y., Qi X., Zhou Y., Guo L., Qin P., Wang Q., Shui W. 2018. Distinct Proteome Remodeling of Industrial *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Prolonged Thermal Stress or Transient Heat Shock. *Journal of Proteome Research*, 17(5): 1812–1825.

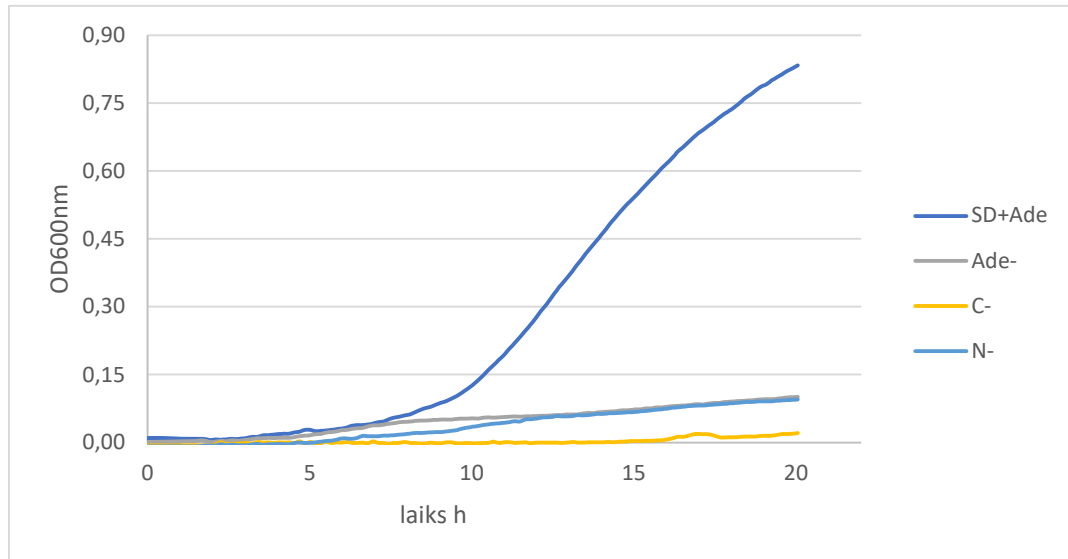
Yamamoto A., Mizukami Y., Sakurai H. 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12): 11911–11919.

Yamamoto N., Maeda Y., Ikeda A., Sakurai H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(5): 783–790.

PIELIKUMI

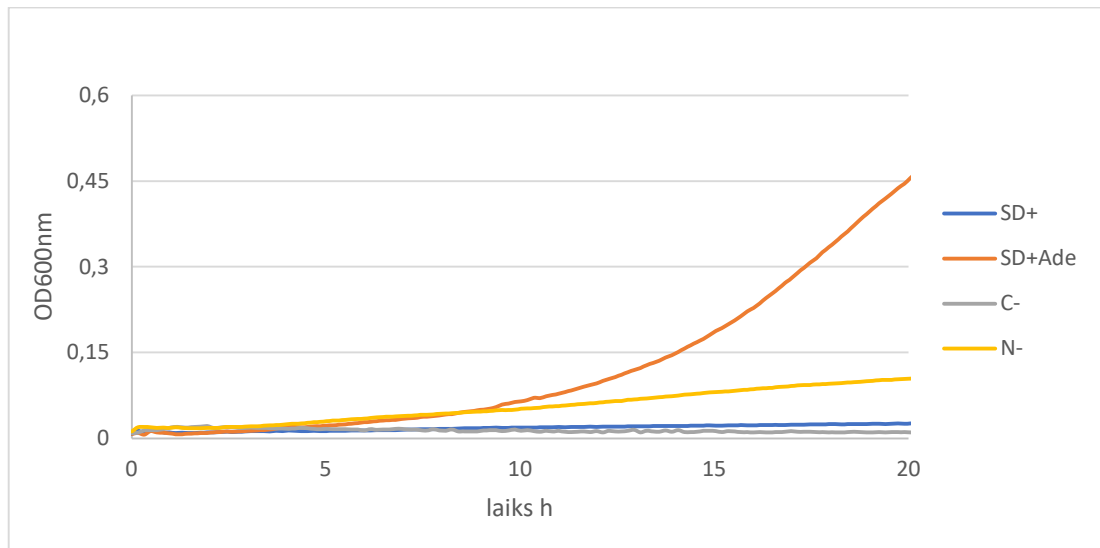
1. pielikums

Celma $\Delta ade2$ augšanas līknes eksponenciālās fāzes laikā pilnajā barotnē SD+, barotnē bez adenīna jeb Ade-, barotnē bez oglekļa avota jeb C-, barotnē bez slāpekļa avota N-.



2.pielikums

Celma $\Delta ade8$ augšanas līknes pilnajā barotnē ar adenīnu SD+Ade barotnē bez adenīna jeb SD+, barotnē bez oglekļa avota jeb C-, barotnē bez slāpekļa avota N-.



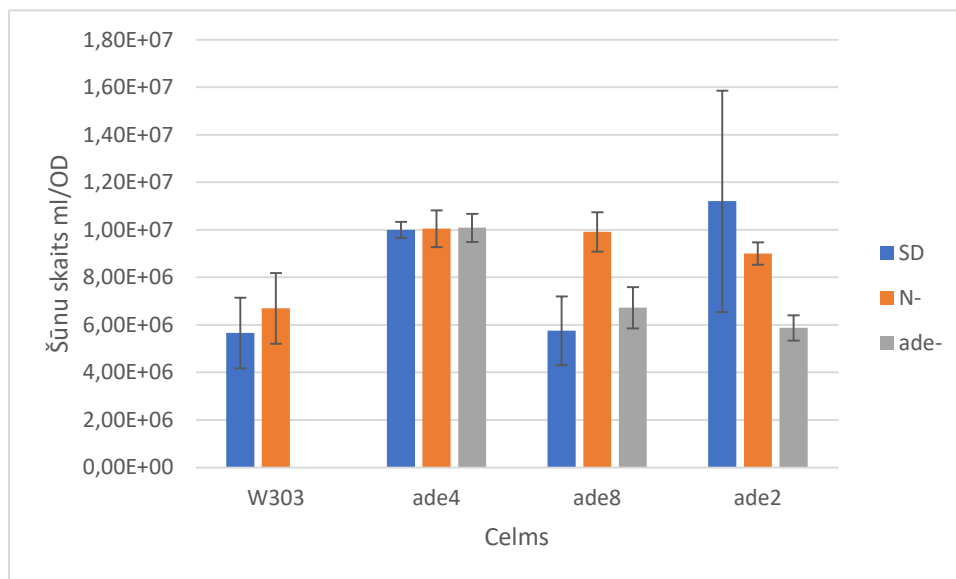
3. pielikums

Raugu celmu dubultošanās laiks un specifiskais augšanas ātrums dažādās barotnēs.

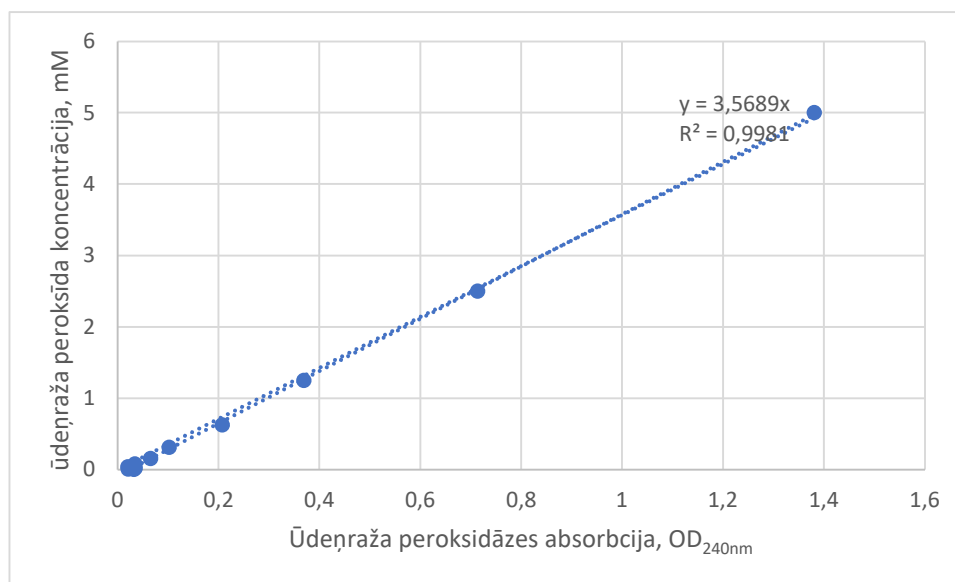
Rauga celms Yeast strain	Barotne Media	Dubultošanās laiks, h Doubling time, h	Specifiskais augšanas ātrums, h ⁻¹ Specific growth rate, h ⁻¹
W303	SD+	1,32	0,52
	SD+ Ade	1,32	0,52
$\Delta ade4$	SD+ Ade	1,45	0,45
$\Delta ade8$	SD+ Ade	1,23	0,56
$\Delta ade2$	SD+ Ade	1,88	0,37

4. pielikums

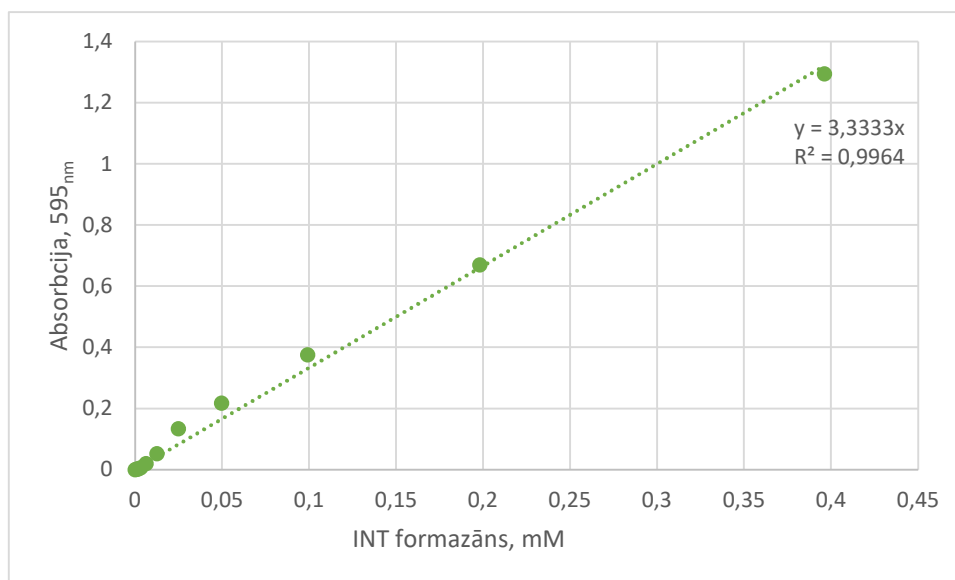
Badinātu raugu šūnu skaits ml/OD pilna sastāva barotnē SD+, barotnē bez slāpekļa avota N-, barotnē bez adenīna avota ade-.



Ūdeņraža peroksīda standartlīknes slīpuma koeficients



Formazāna standartlīknes slīpuma koeficients



Bakalaura darbs „ Maizes rauga adenīna biosintēzes ceļa mutāciju ietekme uz oksidatīvā un karstuma stresu izturību” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Sandra Seimuškina 28.05.2021.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag.biol. Zane Ozoliņa 28.05.2021

Recenzents: Dr.biol. Uldis Kalnenieks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 28.05.2021.

Lietvede:

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: