

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Katriin Antonov

***Saccharomyces cerevisiae* klass III *pet* mutantide  
filamenteerumine ja invasiivne kasv**

Magistritöö

Juhendaja PhD Tiina Tamm

TARTU 2015

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. <i>S. cerevisiae</i> erinevad kasvuvormid.....	7
1.2. Filamentne kasv.....	8
1.2.1. <i>FLO</i> geenide perekond.....	9
1.2.2. Filamentse kasvu regulatsioon.....	11
1.3. <i>Pet</i> mutandid.....	13
1.3.1. Hingamisahel ja mitokondriaalne DNA.....	13
1.3.2. Hingamisahela mutandid.....	14
1.4. Mitokondri roll filamenteerumisel.....	16
1.4.1. RTG rada.....	16
1.4.2. Filamenteerumine ja invasiivne kasv <i>rho</i> mutantides.....	18
2. TÖÖ EESMÄRK.....	20
3. EKSPERIMENTAALOSA.....	21
3.1. Materjalid ja meetodid.....	21
3.1.1. Töös kasutatud tüved.....	21
3.1.2. Töös kasutatud söötmed ja kasvutingimused.....	23
3.1.3. Deletsioonitüvede konstrueerimine.....	23
3.1.4. Diploidide konstrueerimine.....	23
3.1.5. DNA värvimine DAPI-ga.....	24
3.1.6. Tilk-külv meetod.....	24
3.1.7. Invasiivse kasvu analüüs.....	24
3.1.8. Butanooli poolt indutseeritud filamenteerumine.....	25
3.1.9. Totaalse RNA eraldamine ja qRT-PCR analüüs.....	25
3.1.10. Signaaliülekanalade analüüs kasutades reporterplasmidi.....	26
3.2. Tulemused.....	28
3.2.1. Klass III <i>pet</i> mutantide konstrueerimine ning nende fenotüübiline analüüs.....	28
3.2.2. Klass III <i>pet</i> mutantide filamentne kasv.....	34
3.2.3. Klass III <i>pet</i> mutantide invasiivne kasv.....	36
3.2.4. <i>FLO11</i> ekspressioonitase klass III <i>pet</i> mutantides.....	39
3.2.5. <i>CIT2</i> ekspressioonitase klass III <i>pet</i> mutantides.....	40

3.2.6. FG MAPK signaaliülekaneraja aktiivsus klass III <i>pet</i> mutantides .....	41
3.2.7. cAMP-PKA signaaliülekaneraja aktiivsus klass III <i>pet</i> mutantides .....	42
<b>4. ARUTELU</b> .....	<b>43</b>
<b>5. KOKKUVÕTE</b> .....	<b>48</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>50</b>
<b>TÄNUAVALDUSED</b> .....	<b>52</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>53</b>
<b>LISAD</b> .....	<b>63</b>
<b>Lisa 1. Deletsioonitüvede konstrueerimiseks kasutatud praimerid</b> .....	<b>63</b>
<b>Lisa 2. qRT-PCR reaktsioonis kasutatud praimerid</b> .....	<b>64</b>
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	<b>65</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

bp	– aluspaar ( <i>base pair</i> )
cAMP-PKA	– tsükliilise adenosiinmonofosfaadi poolt aktiveeritud proteiinkinaas A signaaliülekanerada ( <i>cyclic adenosine monophosphateprotein kinase A</i> )
DAPI	– 4,6-diamidiino-2-fenüülindool
DMSO	– dimetüül sulfoksiid
DTT	– ditiotreitool
EDTA	– etüleendiamiintetraatseet hape
FG MAPK	– filamenteerumisspetsiifilise mitogeeni poolt aktiveeritava proteiinkinaasi signaaliülekanerada ( <i>filamentous growth specific mitogen-activated protein kinase</i> )
FREs	– filamenteerumisvastusega seotud järjestused ( <i>filamentous response elements</i> )
G418	– genetitsiin
GPI	– glükofosfatidüülinositol
Leu	– leutsiin
mtDNA	– mitokondriaalne DNA
Nat	– nourseotritsiin
ORF	– avatud lugemisraam
PCR	– polümeraasi ahelreaktsioon
PMSF	– fenüülmetüülsulfünüül floriid
rpm	– pööret minutis
RTG	– retrograadne signaaliülekanerada ( <i>retrograde signaling pathway</i> )
SDS	– naatriumdodetsüülsulfaat
SNF	– mittefermenteeritava süsinikuallika poolt aktiveeritav signaaliülekanerada ( <i>sucrose nonfermentable</i> )
TCA	– tsitraaditsükkel
TOR	– rapamütsiini-sihtmärk signaaliülekanerada ( <i>target of rapamycin</i> )
Tris	– tris(hüdroksümetüül)aminoetaan
Ura	– uratsiil
WT	– metsiktüüp
qRT-PCR	– kvantitatiivne pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon

## SISSEJUHATUS

Rakkude diferentseerumine on protsess, mille käigus muutuvad diferentseerumata rakud mitmesuguste tegurite toimel teistsuguse morfoloogiaga ja/või funktsiooniga rakkudeks. Selle muutumise ajal toimivad koordineeritult mitmed erinevad signaaliülekanalad. Eukariootse ja üherakulise organismina on pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* hea mudelorganism metaboolsete ja reguleerivate radade uurimiseks, sest enamasti neid radasid on kõrgelt konserveerunud. Vastusena välistele teguritele suudab pagaripärm *S. cerevisiae* valida mitmete eri kasvuvormide vahel. Näiteks feromoonide esinemisel kasvukeskkonnas hakkavad rakud paarduma ja moodustama diploide (Bardwell jt., 2005), toitainete puudusel filamenteeruma ja invaseeruma agarisse (Gimeno jt., 1992; Cullen & Sprague, 2000).

Filamentset kasvu on kirjeldatud paljudel seentel. Patogeenidel on nimetatud protsess vajalik kinnitumiseks biotilistele ja abiotilistele pindadele ning virulentsuseks (Sudbery, 2011). Filamenteerumine on reguleeritud evolutsiooniliselt konserveerunud signaaliülekanaladega, mistõttu sobivad nimetatud protsessi uurimiseks pagaripärm *S. cerevisiae* tüved. Filamenteerumisel toimuvad metsiktüüpi rakkudes ümberkorraldused morfoloogias, geeniekspressioonis ja metabolismis muutes rakkude paljunemise ja toitainete omastamise efektiivsemaks.

Filamentset ja invasiivset kasvu on seostatud funktsionaalse hingamisahela esinemisega. Hingamisahela komponente kodeeritakse nii mtDNA kui ka tuumagenoomi poolt. *Rho* mutantides, kus mtDNA on defektne või puudub, on häirunud hingamisahela komplekside III, IV ja V kokkupanek ning suksinaadi oksüdatsioon fumaradiiks (Zara jt., 2004; Ebner & Schatz, 1973; Schatz jt., 1968). *Rho* mutantides on kirjeldatud vastus toitainete puudusele erinev metsiktüüpi rakkudest. Filamenteerumisel moodustub hargnenud filamente vähem ning invaseerumine agarisse on osaliselt pärsitud (Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008; Aun jt., 2013).

Antud töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad mutatsioonid hingamisahela üksikutes kompleksides filamentse ja invasiivse kasvu vastust. Seda saab uurida kasutades klass III *pet* mutante. Nendes mutantides säilib metsiktüüpi mtDNA, hingamisahel on defektne mutatsioonide tõttu tuumagenoomis, mis inaktiveerivad iga kompleksi eraldi.

Märksõnad: *Saccharomyces cerevisiae*, *pet* mutandid, invasiivne kasv, filamentne kasv, Flo11, signaaliülekanerajad

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *S. cerevisiae* erinevad kasvuvormid

Pagaripärm *S. cerevisiae* suudab valida mitmete eri kasvuvormide vahel vastavalt kasvutingimustele. Tahketel substraatidel, mis on avatud õhule, moodustavad rakud kolooniaid, mis ei ole adhesiivsed. See on tüüpiline kasvuvorm paljudel laboris kasvatatavatel tüvedel. Vedelsöötmes hõljuvad selliste tüvede rakud üksikult kogu kultuuri ulatuses. Tüvedes, kus toimub adhesiinide ekspressioon, toimub rakkude agregeerumine üksteisega ja kasvusubstraadiga. See on vajalik invasiivselt filamenteeruvate rakkude kasvuks ja biofilmi moodustamiseks. Vedelsöötmes sadenevad agregeeruvad rakud põhja (flokuleerunud kolooniad) või moodustavad vedeliku pinnale kihi (flotatsioon).

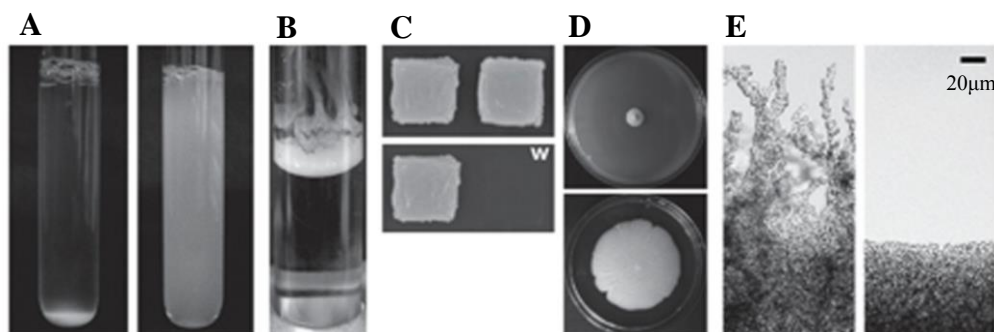
Flokulatsioon on pöörduv ja  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuv protsess *S. cerevisiae* var. *Diastaticus* tüves, kus omavahel agregeeruvad tuhanded vegetatiivsed rakud (Miki jt., 1982; Stratford, 1989) (Joonis 1, paneel A). Flokulatsioonil on suur tööstuslik tähtsus. Selle protsessi abil on võimalik pärmirakke eemaldada fermentatsiooni protsessi lõppedes kiiresti, odavalt ja keskkonnasõbralikult (Bauer jt., 2010; Soares jt., 2000). Lisaks on võimalik flokuleeruvaid pärmütüvesid kasutada bioremedatsioonil keskkonnast  $\text{Ca}^{2+}$  ionide sidumiseks (Wang & Chen, 2006).

Flotatsioon on protsess, kus agregeerunud rakud moodustavad ujuva kihi õhu ja vedeliku piirile (Hohl & Cruess, 1938; Freiberg & Cruess, 1955; Martinez jt., 1995; Zara jt., 2005) (Joonis 1, paneel B). Flotateerunud rakkudel on parem juurdepääs hapnikule ja seetõttu on nad võimelised kasutama teisi mittefermenteeritavaid süsinikuallikaid, näiteks glütserooli ja etüülatsetaati (Cortes jt., 1999; Zara jt., 2010). Selliseid rakutüvesid kasutatakse mitmete alkoholsete jookide valmistamisel, näiteks šerri puhul (Allan, 1939; Pretorius, 2000).

Biofilmi moodustavad tüved, kus toimub agregatsioon rakkude vahel ja kinnitumine erinevatele abiootilistele ja biootilistele substraatidele (Joonis 1, paneel D). *S. cerevisiae* puhul võivad nendeks olla näiteks plastik ja agar (Roberts & Fink, 1994; Reynolds & Fink, 2001).

Filamentset kasvu põhjustavad lämmastikuühendite või fermenteeritavate süsinikuallikate puudumine (Zaman jt., 2008; Cullen & Sprague, 2000). *S. cerevisiae*

rakkudele on iseloomulik pseudohüüfne kasv, kus rakkude pooldumisel toimub tütarraaku täielik eraldumine tsütokineesil, kuid rakud jäävad üksteisega kinnitunuks rakukesta valkude abil (Gimeno jt., 1992) (Joonis 1, paneel E). Lisaks sellele suudavad haploidsed rakud kasvada agari sisse, protsessi nimetatakse invasiivseks kasvuks (Palkova & Vachova, 2006) (Joonis 1, paneel C).



Joonis 1. Pagaripärm *S. cerevisiae* erinevad kasvuvormid. (A) Flokulatsioon. Vasakul pildil flokuleeruv, paremal mitteflokkuleeruv pärmitüvi, vedelkultuuri segati ja hoiti paigal 15 sek, mille jooksul flokkuleeruva pärmitüve rakud sadenesid põhja. (B) Flotatsioon. Koloonia kasv 4 päeva möödudes vedelsöötmes, rakud moodustasid kihi söötme pinnale. (C) Invasiivne kasv. Vasakul *FLO11* ekspresseeriv tüvi, paremal  $\Delta$ *flo11* tüvi. Alumine pilt pärast pesu veega. Mitteinvasiivsed rakud ei kinnitu agarile. (D) Biofilmi moodustumine. Ülemisel pildil  $\Delta$ *flo11* tüvi, alumisel pildil *FLO11* ekspresseeriv tüvi. Koloonia kasv 10 päeva möödudes poolvedelal agaril. (E) Filamentne kasv. Vasakul *FLO11* ekspresseeriv tüvi, paremal  $\Delta$ *flo11* tüvi. Filamentide moodustamine koloonia servas 4 päeva möödudes kasvades tardsöötmel (muudetud Brückner & Möscher, 2012 järgi).

## 1.2. Filamentne kasv

Filamenteerumisel toimuvad ümberkorraldused rakkude morfoloogias, geeniekspressioonis ja metabolismis muutes rakkude paljunemise ja toitainete omastamise efektiivsemaks. Rakkude kuju muutub piklikumaks, toimub polaarsuse reorganiseerumine ja suureneb rakk-rakk adhesiooni võime.

Filamentne kasv on kirjeldatud nii diploidsetel kui ka haploidsetel rakkudel. Stiimulid, mis seda protsessi algatavad, on rakkudel erinevad. Nälja tingimustes, kui mittefermenteeritavad süsinikuallikad on keskkonnas olemas, diploidsed rakud

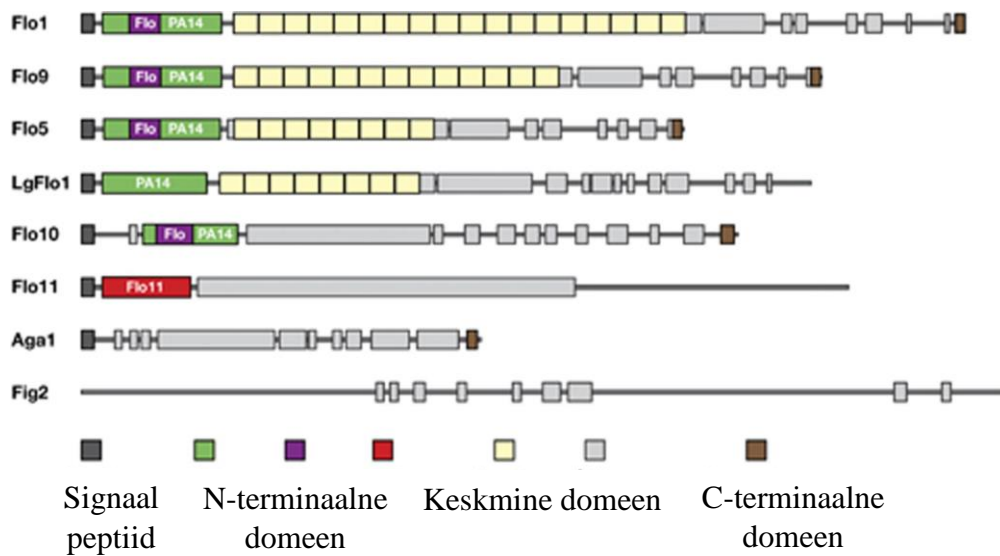
sporuleeruvad. Kui fikseeritud lämmastiku ja glükoosi tase keskkonnas langeb kiiresti, lülituvad diploidsed rakud ümber pseudohüüfsele kasvule (Zaman jt., 2008). Haploidsed rakud hakkavad moodustama filamente lämmastiku nälja tingimustes kui keskkonnas on lühikese ahelaga alkoholid (Lorenz jt., 2000) ja kasvama invasiivselt glükoosi nälja korral (Cullen & Sprague, 2000).

Filamenteerumise protsessi on seostatud ka patogeensete pärmide (nt *Candida albicans*) virulentsusega (Sudbery, 2011). Signaaliülekanerajad, mis reguleerivad ümberlülitumist erinevate kasvuvormide vahel, on konserveerunud mõlemas pärmiliigis. Lisaks on filamentse kasvu regulatsioon heaks mudeliks eukarüootsete rakkude diferentseerumise uurimisel.

Laborites kõige laialdasemalt kasutusel olev *S. cerevisiae* tüvi S228C ei ole võimeline kasvama pseudohüüfsele ega ole sobilik mtDNA uurimiseks. S288C tüvedes ei ekspresseerita *FLO11* nonsenssmutatsiooni tõttu transkriptsiooni aktivaatoris *FLO8* (Liu jt., 1996). S228C sisaldab mutatsiooni transkriptsioonifaktoris *HAPI*, mis lokaliseerub mitokondris ja tuumas ning on seotud raua ja hapniku tasemetele vastava geeniekspressiooni reguleerimisega (Pfeifer jt., 1989). S288C sisaldab ka *MIP1* alleelset varianti, mis tõstab *petite* kolooniate sagedust (Mortimer & Johnston, 1986). Filamentse kasvu uurimiseks on kõige sobilikum *S. cerevisiae* tüvi  $\Sigma$ 1278b, kus ekspresseeruvad adhesiooniks vajalikud adhesiinid (Granek & Magwene, 2010).

### 1.2.1. *FLO* geenide perekond

Kirjeldatud on 8 mitmerakulise kasvu indutseerimisel olulist *FLO* geenide perekonda kuuluvat rakupinna adhesiini: Flo1, LgFlo1, Flo5, Flo9, Flo10, Flo11, Aga1 ja Fig2 (Teunissen jt., 1993; Bidard jt., 1994; Lambrechts jt., 1996; Guo jt., 2000). Nende geenide poolt kodeeritud valgud kuuluvad suurde glükosüülfosfatidüülinositol (GPI)-seotud rakukesta glükoproteiinide perekonda, millele on iseloomulik kolmest domeenist koosnev struktuur: N-terminaalne, transmembraane ja C-terminaalne domeen (Verstrepen jt., 2004) (Joonis 2). N-terminaalne domeen ulatub raku pinnalt välja ja omab olulist rolli *trans*-ligand molekulide äratundmisel ja sidumisel. Keskmise domeeni pikkusega ja kõrgelt glükosüleeritud sisaldades palju seriini ja treoniini aminohappejääke. C-terminaalne domeen sisaldab GPI ankrut. Adhesiinid Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 ja Flo11 vastavad kirjeldatud struktuurile. Adhesiinidel Fig2 ja Aga1 puudub selgelt eristatav N-terminaalne domeen (Verstrepen jt., 2004) (Joonis 2).



Joonis 2. *S. cerevisiae* adhesiinide domeenide organisatsioon. Adhesiinide üldstruktuur on sarnane koosnedes kolmest domeenist. Rohelisega, lilla ja punasega on värvitud N-terminaalne domeen; kollase ja helehalliga keskmine domeen; pruuniga C-terminaalne domeen (muudetud Brückner & Mösch, 2012 järgi).

Flokulatsioonil on olulised rakukesta valgud Flo1, Flo5 ja Flo9 (Miki jt., 1982; Kobayashi jt., 1998; Javadekar jt., 2000), mis tunnevad ära spetsiifilisi mannoosi oligomeere ja kasutavad seondumiseks unikaalset  $Ca^{2+}$  siduvat motiivi (Veelders jt., 2010; Goossens jt., 2011). Flokulatsiooni indutseerimiseks on vajalik  $Ca^{2+}$  esinemine keskkonnas ja vähemalt ühe eelnevalt nimetatud valgu ekspressioon (Smukalla jt., 2008). Flotatsioon sõltub ainult ühe valgu, Flo11 ekspressioonist (Zara jt., 2005), mis on vajalik rakupinna hüdrofoobsuse muutmisel (Reynolds & Fink, 2001). Biofilmi moodustumisel on olulised Flo10, Flo11 ja Fig2, mis võimaldavad kinnitumist substraadile (Van Mulders jt., 2009). Aga1 ja Fig2 on olulised pärmirakkude paardumisel (Roy jt., 1991; Zhang jt., 2002).

*FLO11* ekspressioon on vajalik  $\Sigma 1278b$  päritoluga tüvedes invasiivseks kasvuks (Kuchin jt., 2002; Lo jt., 1996), filamentide moodustamiseks (Lambrechts jt., 1996; Lo jt., 1998) ning biofilmi tekkeks plastikul ja agaril (Reynolds jt., 2001).  $\Sigma 1278b$  tüvedes on *FLO11* ainus *FLO* geenide perekonda kuuluv geen, millelt toimub ekspressioon, teised geenid on vaigistatud (Guo jt., 2000). *FLO11* asub *S. cerevisiae* 9. kromosoomi väikeses õlas ja on 4104bp pikk. *FLO11* promootor on suurem kui 3kb ja sisaldab mitmeid ülesvoolu asuvaid aktivatsiooni ja repressiooni järjestusi (Lo & Dranginis, 1996; Rupp jt., 1999). *FLO11* ekspressioon on reguleeritud rohkem kui 20 erineva transkriptsiooni- ja

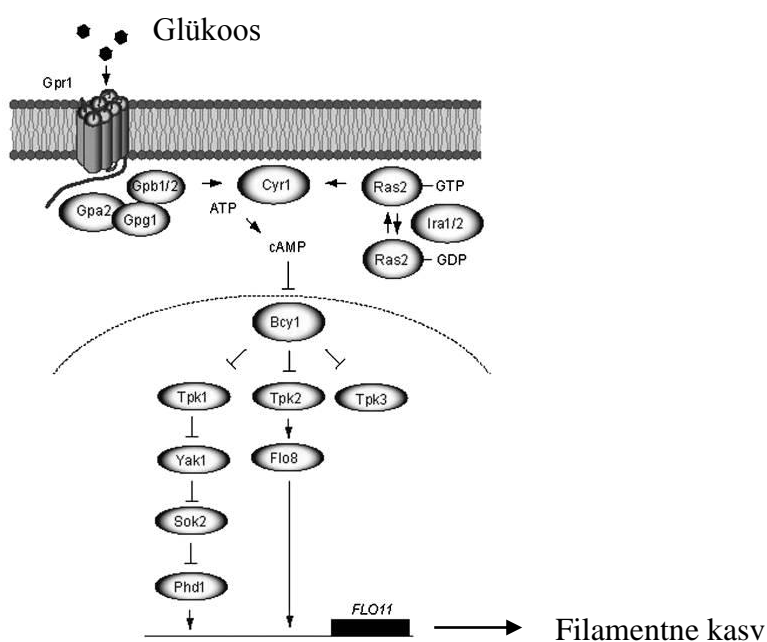
kromatiini remodelleerimisfaktori poolt (Brückner & Mösch, 2012), mida aktiveerivad aminohapete, lämmastiku ja glükoosi nälg, rakusisese pH muutus ning feromoonide taseme langus kasvukeskkonnas.

### 1.2.2. Filamentse kasvu regulatsioon

Üleminek üherakuliselt kasvult filamentsele kasvule on kõrgelt reguleeritud protsess. Kirjeldatud on mitmeid signaaliülekanderadasid, mis on seotud filamentse kasvu regulatsiooniga: tsüklilise adenosiinmonofosfaadi poolt aktiveeritud proteiinkinaas A signaaliülekanderada (cAMP-PKA, *cyclic adenosine monophosphateprotein kinase A*), mittefermenteeritava süsinikuallika poolt aktiveeritav rada (SNF, *sucrose nonfermentable*), rapamütsiini-sihtmärk signaaliülekanderada (TOR, *target of rapamycin*) ja filamenteerumisspetsiifilise mitogeeni poolt aktiveeritava proteiinkinaasi rada (FG MAPK, *filamentous growth specific mitogen-activated protein kinase*). Kuna käesolevas töös uuriti cAMP-PKA ja FG MAPK radade aktivatsiooni erinevates mutantides, siis peatükkides 1.2.2.1. ja 1.2.2.2. antakse nendest radadest põhjalikum ülevaade.

#### 1.2.2.1. cAMP-PKA rada

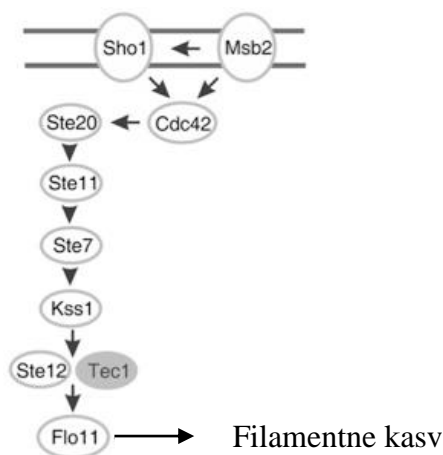
cAMP-PKA raja aktiveerimiseks pärmides on leitud kaks stiimulit: rakusisese pH taseme langus ja glükoosi lisamine derepresseeritud rakkudele (Thevelein jt., 1987). cAMP taseme alusel otsustatakse, kas rakkudes toimub üleminek filamentsele kasvule või mitte (Mösch jt., 1996). cAMP taseme tõusu rakkudes põhjustab membraan-seoselise ensüümi adenülaattsüklaasi Cyr1 aktivatsioon (Toda jt., 1985) (Joonis 3). Aktivatsioon toimub läbi Cyr1 assotsieerumise GTP-seonduva valgu Ras2-ga (Toda jt., 1985) või Gpr1-Gpa2 retseptor süsteemi (Kübler jt., 1997). Selle tulemusena tõuseb rakusisene cAMP kontsentratsioon ning dissotseeruvad inhibiitorid Bcy1 ja PKA-d. *S. cerevisiae*'s esineb 3 erinevat PKA valku: Tpk1, Tpk2 ja Tpk3. Neil on ligikaudu 75% ulatuses homoloogiline katalüütiline domeen, erinevus üksteisest asub N-terminaalses regioonis (Toda jt., 1987). Tpk2 on vajalik filamenteerumiseks. Tpk2 fosforüleerib transkriptsioonifaktori Flo8, mis omakorda aktiveerib filamenteerumiseks vajalike geenide ekspressiooni (Pan & Heitman, 1999; Robertson & Fink, 1998). Tpk1 ja Tpk3 on filamentset kasvu inhibeerivad. Tpk1 fosforüleerib türosiin kinaasi Yak1 põhjustades valgu inaktivatsiooni (Deminoff jt., 2006). Aktiivne mittefosforüleeritud Yak1 reguleerib transkriptsioonifaktoried Sok2 ja Phd1, mis on vajalikud *FLO11* ekspressiooniks (Malcher jt., 2011).



Joonis 3. cAMP-PKA signaaliülekanerada. Glükoosi taseme tõus aktiveerib cAMP-PKA raja põhjustades cAMP kontsentratsiooni tõusu rakkudes ning inhibiitorite dissotsiatsiooni. Tpk2 aktiveerib, Tpk1 ja Tpk3 inhibeerivad *FLO11* ekspressiooni (muudetud Cullen & Sprague, 2012 järgi).

#### 1.2.2.2. FG MAPK rada

FG MAPK rada aktiveeritakse transmembraanse osmosensori Sho1 ja rakupinna glükoproteiin Msb2 poolt, mis moodustavad kompleksi GTP-seoselise kinaasi Cdc42-ga (Cullen jt., 2004; Cullen jt., 2000) (Joonis 4). Cdc42 seondumine Ste20-ga on vajalik Ste20 lokaliseerimiseks plasmamembraani ja filamenteerumise indutseerimiseks (Leberer jt., 1997; Peter jt., 1996). Ste20 aktiveerib neljast kinaasist koosneva kaskaadi: Ste20→Ste11→Ste7→Kss1. Kss1 on filamenteerumisspetsiifiline kinaas, mis aktiveerib transkriptsioonifaktorid Tec1 ja Ste12. Tec1 kindlustab seondumise DNA-ga ja Ste12 transkriptsiooni aktivatsiooni domeen reguleerib ekspressiooni (Zeitlinger jt., 2003). Moodustunud kompleks seondub filamenteerumisvastusega seotud järjestustega (*filamentous response elements*, FREs) märklaud promootoritel *FLO11*, *MSB2* ja *TEC1* (Lo & Dranginis, 1998; Madhani & Fink, 1997). Tec1 võib aktiveerida *FLO11* ekspressiooni ka Ste12 sõltumatult (Heise jt., 2010). Filamenteerumise indutseerib *FLO11* ekspressioon, *MSB2* ja *TEC1* ekspressioon reguleerivad filamenteerumist positiivse tagasiside kaudu.

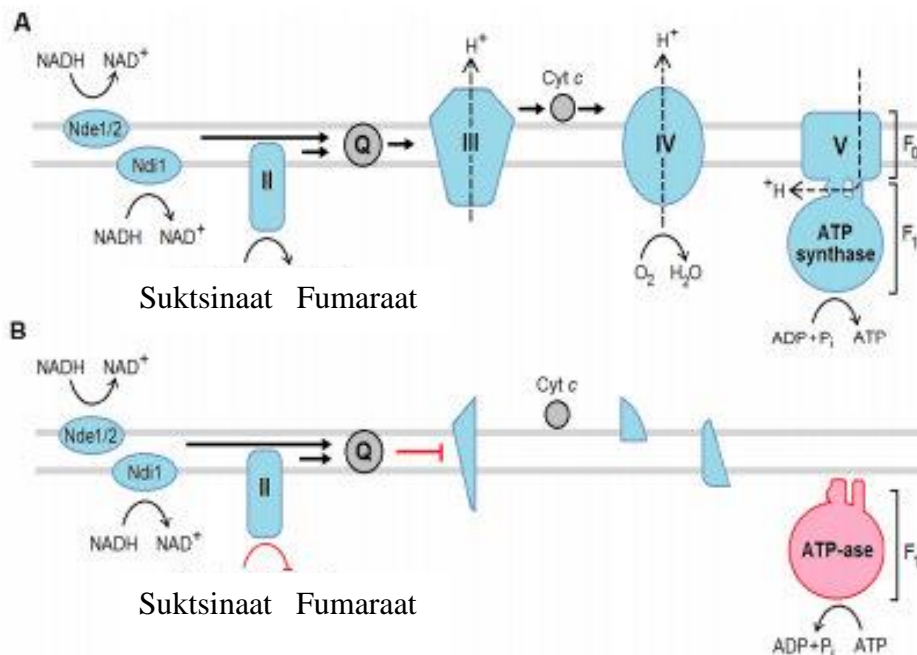


Joonis 4. FG MAPK signaaliülekanerada. Sho1 ja Msb2 moodustavad kompleksi GTP-seoselise kinaasi Cdc42-ga. Cdc42 aktiveerib kaskaadi Ste20→Ste11→Ste7→Kss1, mis aktiveerivad transkriptsioonifaktorid Tec1 ja Ste12. Tec1 ja Ste12 seonduvad *FLO11* promootorile indutseerides filamentteerumise (muudetud Aun jt., 2013 järgi).

### 1.3. *Pet* mutandid

#### 1.3.1 Hingamisahel ja mitokondriaalne DNA

Mitokonder on fosfolipiidse kaksikmembraaniga kaetud organell, millel on oma genoom (mtDNA). Mitokondri põhiülesanne rakkudes on energia tootmine elektronide transpordiahela vahendusel, mis koosneb neljast mitokondri sisemembraanis asuvast kompleksist (Joonis 5, paneel A). Pagaripärmil *S. cerevisiae* puudub kompleks I, selle asemel on NADH dehüdrogenaasid Ndi1 ja Nde1/2, mis viivad elektronid üle tsütosoolis ja mitokondri maatriksis genereeritud NADH-lt ubikinoonile (Yamashita jt., 2007). Kompleksis II toimub suktsinaadi oksüdeerumine fumaraadiks ja lisanduv elektronide ülekande ubikinoonile. Ubikinoonilt kantakse elektronid üle tsütokroom c-le ubikinoon-tsütokroom c reduktaasil (kompleks III) pumbates samal ajal prootoneid mitokondri maatriksist välja. Tsütokroom c vahendusel viiakse elektronid üle tsütokroom c oksüdaasil O<sub>2</sub>-le (kompleks IV). Elektronide liikumisega kompleksides III ja IV tekitatakse organelli sisemembraanile prootonite gradient, mida rakk kasutab adenosiintrifosfaadi (ATP) sünteesiks kui keskkonnas esineb hapnik (Hatefi, 1985). Komplekside subühikuid, mida on vaja hingamisahela funktsioneerimiseks kodeeritakse nii tuuma- kui ka mitokondri genoomi poolt.



Joonis 5. *S. cerevisiae* hingamisahel (A) metsiktüüpi tüvedes ja (B) *rho* mutantides (muudetud Aun, 2014 järgi).

Pagaripärmi mtDNA suurus on ligikaudu 85 kiloaluspaari ja see on organiseeritud kompaktses DNA-valk struktuurina (nukleoidina). mtDNA sisaldab 8 geeni: ühte hingamisahela kompleks III subühikut *COB*, kolme kompleks IV subühikut *COX1*, *COX2* ja *COX3*, kolme ATP süntaasi subühikut *ATP6*, *ATP8*, *ATP9* ning ribosomaalse valgu geeni *VARI*. Lisaks sellele kodeeritakse mtDNA-lt mitokondriaalse translatsioonisüsteemi jaoks vajalikke 21S ja 15S ribosomaalseid RNA-sid, 24 tRNA-d, RNAasi P komponenti 9S RNA-d, mis on vajalik pre-tRNA protsessimisel (Foury jt., 1998).

### 1.3.2. Hingamisahela mutandid

Mutatsioonid mtDNA-s või mtDNA puudumine ei ole pagaripärmi rakkude jaoks letaalne kui kasvukeskkonnas on fermenteeritavat süsiniku allikat. mtDNA on hädavajalik hingamisahela toimimiseks. Tüvesid, kus mtDNA on defektne või puudub osaliselt nimetatakse *rho*<sup>-</sup> tüvedeks ja tüvesid, kus mtDNA puudub täielikult, *rho*<sup>o</sup> tüvedeks. *Rho* mutantides puudub funktsioneeriv elektronitranspordiahel ja on häiritud ATP süntees, kuna puuduvad komplekside III, IV ja V subühikud ning häiritud on suktsinaadi oksüdatsioon fumaradiks (Zara jt., 2004; Ebner & Schatz, 1973; Schatz jt., 1968) (Joonis 5, paneel B).

*S. cerevisiae* on fakultatiivne anaeroob ja suuteline ATP-d tootma ka kääritamisel. Eelistatud energiatootmis viisiks on glükolüüs ka juhul kui keskkonnas esineb hapnik. Alternatiivsed rajad on sel juhul repressseeritud (Adams jt., 1972). Fermenteeritavate süsinikuallikate puudumisel kasutatakse energia tootmiseks mittefermenteeritavaid süsinikuallikaid (näiteks etanooli, glütserooli või laktaati) (Johnston, 1999). Sellest tulenevalt rikkal glükoosi sisaldaval söötmel puudub erinevus energia tootmise viisis metsiktüüpi tüvede ja *rho* mutantide vahel. Söötmes, kus fermenteeritavad süsinikuallikad on olemas, moodustavad sellised tüved väiksemaid (*petite*) kolooniaid võrreldes metsiktüüpi tüvedega (Ephrussi jt., 1949; de Zamaroczy jt., 1981). *Petite* kolooniaid võivad moodustada ka tüved, kus hingamisahel on defektne tuumagenoomis esinevate mutatsioonide tõttu. Selliseid tüvesid nimetatakse *pet* mutantideks (Ephrussi jt., 1949).

Merz ja Westermann, 2009 töös analüüsiti deletsioonimutantide raamatukogu, kust sõeluti välja 319 *pet* mutanti, mis ei ole võimelised kasvama mittefermenteeritavatel süsinikuallikatel (glütserool, laktaat, etanool). Hingamisdefektsus võib olla põhjustatud mitmest faktorist, mille alusel jagati mutandid nelja klassi. Mutantide klassifitseerimiseks kasutati ristamist *Δmip1* tüvega (*rho*<sup>o</sup>) ja tsütoplasma ülekannet. Kui ristamisel *Δmip1* tüvega taastub heterosügootses diploidis funktsionaalne hingamisahel, näitab see metsiktüüpi mtDNA olemasolu deletsioonimutandis. mtDNA võib olla kaduma läinud ka spontaanselt. Selle testimiseks viidi deletsioonimutantidesse metsiktüüpi mtDNA genoom (nn. tsütoplasma ülekanne) kasutades *kar1* mutatsiooniga *rho*<sup>+</sup> tüve. *Kar1* on vajalik karüogaamia toimumiseks. Tekkinud sügootides ei toimunud tuumade liitumist *kar1* mutatsiooni tõttu, see võimaldas selekteerida *kar1* mutatsiooni kandva tuuma vastu. Katse tulemusel saadi haploidsed tüved, mis sisaldasid deletsioonimutandi tuuma ja *kar1* tüvest pärit tsütoplasmat. Juhul kui mtDNA on kaduma läinud juhuslikult tüve konstrueerimise käigus, siis need mutandid kasvavad glütserooli sisaldaval söötmel. Juhul kui deleteeritud geen on vajalik mtDNA säilitamiseks, siis ülekantud *rho*<sup>+</sup> mtDNA kaob taas ning tüved glütserooli sisaldaval söötmel ei kasva (Merz & Westermann, 2009).

*Pet* geenide klassifikatsioon Merz ja Westermann järgi:

Klass I: geenid, mis on hädavajalikud mtDNA säilitamiseks ning geenid, mis on hädavajalikud hingamiseks (viimaste puhul toimub ka mtDNA kadumine). Nii ristamine *Δmip1* tüvega kui ka tsütoplasma ülekanne ei taasta funktsionaalset hingamisahelat.

Klass II: need mutandid sisaldavad *rho*<sup>+</sup> genoomi, ristamine *Δmip1* tüvega ja tsütoplasma ülekande taastavad võime hingata glütserooli sisaldaval söötmel. Arvatavasti on toimunud mitokondrite vigastamine tüvede konstrueerimise käigus.

Klass III: geenid, mis on hädavajalikud hingamiseks kuid ei ole vajalikud mtDNA säilitamiseks. Nende mutantide puhul *Δmip1* heterosügoodid kasvavad glütserooli sisaldaval söötmel, tsütoplasma ülekande nende võimet hingata ei taasta.

Klass IV: geenid, mis ei ole olulised hingamiseks kuid nendes mutantides toimub aeglane mtDNA kadumine. *Δmip1* heterosügoodid ei kasva glütserooli sisaldaval söötmel, kuid tsütoplasma ülekandmisel hingamisvõime taastub.

## 1.4. Mitokondri roll filamenteerumisel

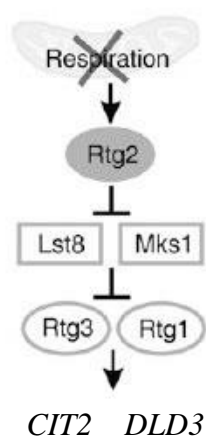
*Rho* mutantides, kus puudub metsiktüüpi mtDNA ja hingamisahel on mittefunktsionaalne. Rakkude elutegevuse säilimiseks kaasnevad sellega suured muudatused tuumageenide ekspressioonis. Aktiveeritakse geenid, mis funktsioneerivad mitokondri biosünteesis, raua regulatsioonis, tsitraaditsükli (TCA tsükkel), peroksüsomaalses metabolismis, toitainete omastamises ning stressi- ja ravimvastuses (Devauz jt., 2002; Epstein jt., 2001; Hallstrom & Moye-Rowley, 2000; Hughes jt., 2000; Traven jt., 2001). Põhiliseks signaaliülekanderajaks, mis tuumageenide ekspressiooni mõjutab, on retrograadne signaaliülekanderada (RTG, *retrograde signalling pathway*).

### 1.4.1. RTG rada

RTG signaaliülekanderada reguleerib lämmastiku ja karbohüdraatide metabolismi rakus (Joonis 6). RTG raja aktiveerumiseks on vajalik Rtg1-Rtg3 kompleksi translokeerumine tuuma (Sekito jt., 2000; Dilova jt., 2002). Rajal on kaks negatiivset regulaatorit, mis takistavad translokeerumist tuuma: Bmh1/2-Mks1 kompleks ja Lst8. Bmh1/2-Mks1 kompleks põhjustab Rtg3 hüperfosforülemise, mis takistab Rtg1-Rtg3 kompleksi liikumist tuuma. Mitokondri membraanipotentsiaali langemise tunneb ära tsütoplasma valk Rtg2, millel on N-terminaalne ATP-seondumis motiiv. Rtg2 põhjustab Bmh1/2-Mks1 kompleksi lagunemise (Liu & Butow, 1999) ja seeläbi Rtg3 defosforülemise (Sekito jt., 2000).

Mittefunktsionaalne hingamisahela kompleks II põhjustab ka tsitraaditsükli peatumise, kuna häirunud on suksinaadi oksüdatsioon fumaraadiks (Cecchini, 2003).

Tsitraaditsükli kolm esimest etappi on aktiivsed, kuni on piisavalt tsitraati. Tsitraaditsükli peatumisel langeb tsitraadi tase rakus, mistõttu on häiritud glutamiini süntees.  $\alpha$ -ketoglutarat, mida sünteesitakse TCA tsükli, on glutamaadi eellasmolekul (Gimeno jt., 1992). Glutamiini sünteesi peatumise tunneb ära teine RTG raja negatiivne regulaator Lst8. Lst8 seondumine Tor1/2-ga põhjustab Rtg3 defosforüleerumise (Dilova jt., 2002; Chen & Kaiser, 2003; Liu jt., 2001).



Joonis 6. RTG signaaliülakanderada (muudetud Aun jt., 2013 järgi).

Rtg3 defosforüleerumine aktiveerib Rtg1-Rtg3 kompleksi, mis translokeerub tuuma ja seondub heterodimeerina GGTCAC järjestusele (*R-box*'ile) *CIT2* ja *DLD3* promootoritel ning aktiveerib transkriptsiooni (Chelstowska jt., 1999; Jia jt., 1997). *CIT2* aktivatsioon põhjustab nende geenide üleekspressioonimise, mis on seotud glüoksülaadi tsükli ja rasvhapete  $\beta$ -oksüdatsiooniga peroksüsoomides, atsetüül-CoA sünteesi ja transpordiga mitokondritesse ning oksaalatsetaadi sünteesi pürovaadist (Epstein jt., 2001; Liu & Butow, 2006). *DLD3* aktivatsioon on seotud püruvaadi sünteesiga D-laktaadist (Chelstowska jt., 1999) (Joonis 7).



*Rho* rakkudes on näidatud RTG raja aktiveerumist (Liu & Butow, 2006), mistõttu oldi pikka aega arvamusel, et just see signaaliülekanne rada võiks olla seotud defektse filamentse ja invasiivse kasvuga. Küll aga RTG raja inaktiveerimine *RTG2* deleteerimisel *rho* mutantides ei taasta filamentset ega invasiivset kasvu. Veelgi enam raja inaktiveerumine *rho*<sup>+</sup> rakkudes inhibeerib filamentide moodustamise ja *FLO11* ekspressiooni (Aun jt., 2013). *RTG1* deleteerimine *rho*<sup>+</sup> rakkudes blokeerib invasiivse kasvu täielikult (Chavel jt., 2010).

Näitatud on, et *rho* mutantides langeb *FLO11* ekspressioonitase (Aun jt., 2013). *FLO11* ekspressioon on reguleeritud rohkem kui 20 erineva transkriptsiooni- ja kromatiini remodelleerimisfaktori poolt (Brückner & Mösch, 2012). Filamenteerumise ja invasiivse kasvu seisukohalt mõjutavad *FLO11* ekspressioonitaset kõige rohkem FG MAPK ja cAMP-PKA rajad

FG MAPK signaaliülekanne rada on aktiivne nii *rho*<sup>+</sup> rakkudes kui ka *rho* mutantides (Aun jt., 2013). FG MAPK raja inaktiveerimine transkriptsioonfaktori *TEC1* deleteerimisel põhjustab filamenteerumise ja invasiivse kasvu täieliku kadumise nii *rho*<sup>+</sup> rakkudes kui ka *rho* mutantides (Aun jt., 2013; Lorenz jt., 2000; Mösch jt., 1999). *Δtec1* rakkudes ei teki filamenteerumiseks vajalikku piklikku kuju nagu on kirjeldatud metsiktüübis (Aun jt., 2013). *Tec1* üleekspresseerimine põhjustab invasiivse kasvu tugevnemist *rho*<sup>+</sup> rakkudes (Foster jt., 2013; Shively jt., 2013). FG MAPK rada mõjutab filamentset ja invasiivset kasvu nii *rho*<sup>+</sup> kui ka *rho*<sup>7°</sup> tüvedes.

cAMP-PKA signaaliülekanne rada ei ole aktiveeritud *rho* mutantides (Enjalbert jt., 2000; Aun jt., 2013). cAMP-PKA raja inaktiveerimine positiivse regulaatori *TPK2* deleteerimisega põhjustab *rho*<sup>+</sup> rakkudes filamenteerumise ja invasiivse kasvu peatumise. *TPK2* üleekspresseerimine *rho*<sup>+</sup> rakkudes põhjustab tugevama invasiivse kasvu ja hüperfilamenteerumise (Pan & Heitman, 1999; Aun jt., 2013). *Rho* mutantides taastab *TPK2* üleekspresseerimine invasiivse kasu, kuid ei mõjuta filamenteerumist (Aun jt., 2013). cAMP-PKA rada mõjutab invasiivset kasvu nii *rho*<sup>+</sup> kui ka *rho*<sup>7°</sup> tüvedes, filamenteerumist vaid *rho*<sup>+</sup> rakkudes.

## 2. TÖÖ EESMÄRK

Hingamisahela komplekside subühikuid kodeeritakse nii mtDNA kui ka tuumagenoomi poolt. *Rho* mutantides, kus mtDNA on defektne või puudub täielikult, puudub funktsionaalne hingamisahel. Mittefunktsionaalne hingamisahel põhjustab ümberkorraldusi rakkude metabolismis ja häiritud on ka filamentne ja invasiivne kasv. Erinevus seisneb moodustatud filamentide pikkuses ja hargnevuses, *rho* mutantides on filamentid lühemad ja hargnevad vähem (Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008; Aun jt., 2013). Kuidas mõjutab üksikute hingamisahela komplekside defektsus filamentse ja invasiivse kasvu vastust saab uurida kasutades klass III *pet* mutante. Neis mutantides on olemas metsiktüüpi mtDNA ning hingamisahela kompleksid on defektsed tuumagenoomis esinevate mutatsioonide tõttu.

Antud töö üldeesmärk on uurida hingamisahela üksikute mittefunktsionaalsete komplekside mõju filamenteerumisele ja invasiivsele kasvule kasutades klass III *pet* mutante.

Käesoleva töö eesmärgiks oli:

1. kontrollida konstrueeritud klass III *pet* mutantide fenotüübilist vastavust;
2. analüüsida klass III *pet* deletsioonimutantide filamentset ja invasiivset kasvu;
3. mõõta deletsioonimutantides *FLO11* ja *CIT2* ekspressioonitasemed;
4. määrata deletsioonimutantides FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekanalade aktiivsused.

### 3. EKSPERIMENTAALOSA

#### 3.1. Materjalid ja meetodid

##### 3.1.1. Töös kasutatud tüved

Töös kasutatud *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b tüved on toodud tabelis 1 ja S288C tüved tabelis 2.

**Tabel 1.** Töös kasutatud *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b tüved.

Tüve nr	Lühend	Genotüüp	Päritolu
SC $\Sigma$ -48	<i>WT</i>	<i>MATa [rho<sup>+</sup>]ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0</i>	Aun jt., 2013
SC $\Sigma$ -139	<i><math>\Delta</math>mip1 a</i>	<i>MATa [rho<sup>o</sup>]ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX6</i>	Aun jt., 2013
SC $\Sigma$ -141	<i><math>\Delta</math>mip1 <math>\alpha</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> [rho<sup>o</sup>]ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX6</i>	Labori kollektsoon
SC $\Sigma$ -710	<i><math>\Delta</math>sdh5</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 sdh5<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -788	<i><math>\Delta</math>sdh2</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 sdh2<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -716	<i><math>\Delta</math>cor1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 cor1<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -790	<i><math>\Delta</math>cbp3</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 cbp3<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -712	<i><math>\Delta</math>cox12</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 cox12<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -714	<i><math>\Delta</math>mss51</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mss51<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -794	<i><math>\Delta</math>atp5</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 atp5<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
SC $\Sigma$ -792	<i><math>\Delta</math>atp23</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 atp23<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Käesolev töö
DIP-01	<i><math>\Delta</math>mip1/+</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0/ leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-02	<i><math>\Delta</math>mip1/ <math>\Delta</math>mip1</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0/ leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX/ mip1<math>\Delta</math>::natMX</i>	Käesolev töö
DIP-03	<i><math>\Delta</math>sdh5/+ <math>\Delta</math>mip1/+</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0/ leu2<math>\Delta</math>0 sdh5<math>\Delta</math>::natMX/SDH5 mip1<math>\Delta</math>::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-04	<i><math>\Delta</math>sdh2/+ <math>\Delta</math>mip1/+</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0/ leu2<math>\Delta</math>0 sdh2::natMX/SDH2 mip1::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-05	<i><math>\Delta</math>cor1/+ <math>\Delta</math>mip1/+</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0/ leu2<math>\Delta</math>0 cor1<math>\Delta</math>::natMX/COR1 mip1<math>\Delta</math>::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-06	<i><math>\Delta</math>cbp3/+</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0/ leu2<math>\Delta</math>0</i>	Käesolev töö

	<i>Δmip1/+</i>	<i>cbp3Δ::natMX/CBP3 mip1Δ::natMX/MIP1</i>	
DIP-07	<i>Δcox12/+</i> <i>Δmip1/+</i>	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 leu2Δ0/ leu2Δ0</i> <i>cox12Δ::natMX/COX12 mip1Δ::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-08	<i>Δmss51/+</i> <i>Δmip1/+</i>	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 leu2Δ0/ leu2Δ0</i> <i>mss51Δ::natMX/MSS51 mip1Δ::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-09	<i>Δatp5/+</i> <i>Δmip1/+</i>	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 leu2Δ0/ leu2Δ0</i> <i>atp5Δ::natMX/ATP5 mip1Δ::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö
DIP-10	<i>Δatp23/+</i> <i>Δmip1/+</i>	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 leu2Δ0/ leu2Δ0</i> <i>atp23Δ::natMX/ATP23 mip1Δ::natMX/MIP1</i>	Käesolev töö

**Tabel 2.** Töös kasutatud *S. cerevisiae* S288C tüved (BY4741 baasil).

Tüve nr	Lühend	Genotüüp	Päritolu
1763	<i>Δyol071w</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>sdh5Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
1529	<i>Δyll041c</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>sdh2Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
3071	<i>Δybl045c</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>cor1Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
1077	<i>Δypl215w</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>cbp3Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
6436	<i>Δylr038c</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>cox12Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
4152	<i>Δylr203c</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>mss51Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
3657	<i>Δydr298c</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atp5Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF
5395	<i>Δynr020c</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atp23Δ::kanMX6</i>	EUROSCARF

### 3.1.2. Töös kasutatud söötmed ja kasvutingimused

*S. cerevisiae* tüvede kasvatamiseks kasutati YPD söödet (1% *Bacto* pärmiekstrakt, 2% *Bacto* peptoon, 2% glükoos). Deletsioonitüvede selekteerimiseks lisati YPD söötmele 200 mg/l genetitsiini (G418). Diploidide selekteerimiseks lisati YPD söötmele 100 mg/l nourseotritsiini (Nat) ja 200 mg/l G418. Funktsionaalse mtDNA olemasolu kontrollimiseks kasutati mittefermenteeritavat süsinikuallikat sisaldavat YPG söödet (1% *Bacto* pärmiekstrakt, 2% *Bacto* peptoon, 3% glütserool). *S. cerevisiae* tüvede filamenteerumise analüüsimiseks kasutati SLAD söödet (2% glükoos, 50 $\mu$ M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,17% pärmi lämmastikaluste segu, millest puudusid aminohapped ja (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), millele oli lisatud 1% isobutanol. Lisaks kasutati selektiivsöödet Sc-Leu-Ura (2% glükoos, 0,67% pärmi lämmastialuste segu, 0,2% aminohapete ja nukleiinhapete segu, kust puudusid leutsiin ja uratsiil). Tardsöötmete tegemisel lisati 2% agarit. Pärmitüvesid kasvatati 30°C juures.

### 3.1.3. Deletsioonitüvede konstrueerimine

Töös kasutatud deletsioonitüvede konstrueerimiseks kasutati EUROSCARF deletsioonimutantide kollektiooni tüvesid, milledest olid uuritavad geenid deleteeritud *kanMX6* kassetiga. Totaalne DNA eraldati LiOAc-SDS meetodil (Lõoke jt. 2011) ning deletsioonikassett amplifitseeriti ORF-ist üles- ja allavoolu jäävaid praimereid kasutades PCR-i reaktsioonil. Kasutatud praimerite järjestused on toodud lisas 1. Saadud fragmendid transformeeriti  $\Sigma$ 1278b metsiktüüpi tüvesse (SC $\Sigma$ -48) LiOAc meetodil (Knop jt., 1999) ning kolooniad selekteeriti YPD tassidel, millele oli lisatud 200 mg/l G418. Deletsioonikasseti integreerumist kontrolliti PCR-i reaktsioonil kasutades geenispetsiifilisi ja *kanMX6* kassetile spetsiifilisi praimereid.

### 3.1.4. Diploidide konstrueerimine

*S. cerevisiae* diploidsete tüvede konstrueerimiseks ristati eelnevalt saadud mutandid (SC $\Sigma$ -710, SC $\Sigma$ -788, SC $\Sigma$ -716, SC $\Sigma$ -790, SC $\Sigma$ -712, SC $\Sigma$ -714, SC $\Sigma$ -794, SC $\Sigma$ -792; paardumistüüp *Mata*) *Amip1* tüvega (SC $\Sigma$ -141, paardumistüüp *Mata*), kasvatati 30°C juures YPD söötmel üleöö ja külvati üksikkolooniate selekteerimiseks välja YPD tardsöötmel, mis sisaldas 100 mg/l Nat ja 200 mg/l G418. Metsiktüübi (SC $\Sigma$ -48, paardumistüüp *Mata*) ja *Amip1* (SC $\Sigma$ -139, paardumistüüp *Mata*) ristamisel *Amip1* tüvega (SC $\Sigma$ -141, paardumistüüp *Mata*) saadud diploide kasvatati 30°C juures üleöö YPD

söötmele ja külvati üksikkolooniate saamiseks YPD tardsöötmele. Diploidsuse kinnitamiseks vaadeldi rakke valgusmikroskoobis.

### 3.1.5. DNA värvimine DAPI-ga

mtDNA olemasolu kontrollimiseks värviti rakke DNA-le seonduva fluorestseeruva värviga DAPI (4,6-diamidiino-2-fenüülindool). Üksikkoloonia külvati YPD vedelsöötmesse ja kasvatati 30°C juures kuni OD<sub>600</sub> väärtuseni 0,6-0,8. 1,5 ml kultuuri tsentrifuugiti ruumitemperatuuril lauatsentrifuugiga 14 000 rpm 20 sek. Rakke pesti 2 korda 1 ml H<sub>2</sub>O-ga. Rakusademele lisati 500 µl 96% etanooli ning rakke hoiti 10 min - 20°C juures. Rakud pesti H<sub>2</sub>O-ga ja suspendeeriti 100 µl DAPI lahuses (10 µg/ml). Rakke inkubeeriti 1 min pimedas, pesti 2 korda H<sub>2</sub>O-ga ja võeti üles 50 µl H<sub>2</sub>O-s. Preparaatide valmistamiseks kanti rakud katteklaasile ning kuivatati. Rakkude sulundamiseks kasutati p-fenüüldiamiini (10 mg/ml) - glütserooli segu (1:10). Rakke vaadeldi Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoobiga kasutades UPlanF1 100x objektiivi. Rakkude pildistamiseks kasutati Olympus DP70 CCD kaamerat. Pilte töödeldi arvutiprogrammiga GIMP 2.8.14 (*GNU Image Manipulation Program*).

### 3.1.6. Tilk-külv meetod

Rakkude kasvu analüüsimiseks kasvatati rakke YPD vedelsöötmes 30°C juures kuni OD<sub>600</sub> väärtuseni 0,6-0,8. Rakukultuurist tehti 4 lahjendust, kus 5 µl kultuuri sisaldaks 2500, 1000, 200 ja 20 rakku. Igast lahjendusest külvati 5 µl rakukultuuri tilgana YPD ja YPG tassidele. Kolooniaid kasvatati 30°C juures YPD tardsöötmele 2 päeva ja YPG tardsöötmele 3 päeva. Kontrollidena kasutati metsiktüüpi (SCΣ-48) ja *Δmip1* (SCΣ-139) tüvesid. Katse viidi läbi kahes korduses.

### 3.1.7. Invasiivse kasvu analüüs

Invasiivse kasvu analüüsimiseks külvati rakud YPD tassile. Tüvesid *Δmip1* (SCΣ-139), *Δatp5* (SCΣ-794) ja *Δatp23* (SCΣ-792) kasvatati 7 päeva, tüvesid *Δsdh5* (SCΣ-710), *Δsdh2* (SCΣ-788), *Δmss51* (SCΣ-714), *Δcox12* (SCΣ-712), *Δcor1* (SCΣ-716) ja *Δcbp3* (SCΣ-790) kasvatati 3 päeva ning metsiktüüpi tüve (SCΣ-48) 2 päeva 30°C juures. Tasse pildistati, pesti voolava veega ning pildistati uuesti. Katse viidi läbi vähemalt kahes korduses.

### 3.1.8. Butanooli poolt indutseeritud filamenteerumine

Filamenteerumise analüüsimiseks kasvatati rakke YPD vedelsöötmes 30°C juures kuni OD<sub>600</sub> väärtuseni 0,6-0,8. Seejärel transformeeriti tüvedesse plasmiidid pRS315 ja pRS316, mis sisaldasid *LEU2* või *URA3* markergeene. Transformatsioon viidi läbi kasutades LiOAc meetodit (Knop jt., 1999) ning kolooniad selekteeriti 30 °C juures Sc–Leu–Ura selektiivsöötmele. 4-6 kolooniat suspendeeriti 500 µl H<sub>2</sub>O-s, tehti 1000x lahjendus ning 100 µl rakususpensiooni plaaditi klaaskuule kasutades SLAD + 1% isobutanooli tardsöötmele. Tassid suleti parafilmiga, et takistada isobutanooli aurustumist. Tüvesid *Amip1* (SCΣ-139), *Δatp5* (SCΣ-794) kasvatati 7 päeva, tüve *Δatp23* (SCΣ-792) kasvatati 5 päeva, tüvesid *Δsdh5* (SCΣ-710), *Δsdh2* (SCΣ-788), *Δmss51* (SCΣ-714), *Δcox12* (SCΣ-712), *Δcor1* (SCΣ-716), *Δcbp3* (SCΣ-790) ja metsiktüüpi tüve (SCΣ-48) kasvatati 3 päeva 30°C juures. Kolooniaid vaadeldi Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoobiga kasutades UPlanF1 20x objektiivi. Kolooniaid pildistati, tasse pesti voolava veega ning pildistati uuesti. Kolooniate pildistamiseks kasutati Olympus DP70 CCD kaamerat. Pilte töödeldi arvutiprogrammiga GIMP 2.8.14 (*GNU Image Manipulation Program*). Katse viidi läbi kahes korduses.

### 3.1.9. Totaalse RNA eraldamine ja qRT-PCR analüüs

Üksikkoloonia kasvatati 30°C juures kuni OD<sub>600</sub> väärtuseni 0,6-0,8. 15 ml rakke tsentrifuugiti (Hettich UNIVERSAL 32R) 4°C juures 4 min 3200 rpm ja pesti 4°C H<sub>2</sub>O-ga. Rakud külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C juures.

RNA eraldamiseks suspendeeriti rakud 120 µl 4°C RNA-puhvrts (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA), lisati võrdne ruumala 0,5 mm klaaskuule ja segati 3 min 4°C juures vorteksil. Seejärel lisati 450 µl RNA-puhver-SDS lahust (RNA puhver, 1,3% SDS) ja 450 µl fenooli (pH 5,5) ning segati vorteksil 3 min 4°C juures. Segu tsentrifuugiti 10 min 14000 rpm 4°C juures, vesifaasile lisati 600 µl fenool(pH 5,0)/kloroformi segu ja tsentrifuugiti 14000 rpm 4°C juures 2 min. Vesifaasi ekstraheeriti 600 µl kloroformiga ja tsentrifuugiti 14000 rpm 4°C juures 2 min. Vesifaasile lisati 16 µl 5M NaCl ja 1 ml 96% etanooli ning RNA sadestati -80°C juures üleöö. RNA sadestamiseks tsentrifuugiti segu 10 min 14000 rpm 4°C juures. Sadestatud RNA-d pesti 70% etanooliga, kuivatati 10 min 30°C juures ja lahustati 50 µl H<sub>2</sub>O-s ning säilitati -80°C

juures. RNA kontsentratsioon mõõdeti Thermo NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer-ga.

5 µg RNA-d töödeldi 4U DNAas I (Thermo) ja 32U Ribolock (Thermo) ensüümiga 1x DNAasi puhvris 37°C juures 30 min. Reaktsioon peatati 4 µl 25 mM EDTA lisamisega ja inkubeerimisega 65°C juures 10 min. RNA puhastamiseks lisati lahusele 110 µl H<sub>2</sub>O-d, 15 µl 3M NaOAc ja 170 µl fenool(pH5,5)/kloroformi segu ning tsentrifuugiti 2 min 14000 rpm 4°C juures. Vesifaasile lisati 375 µl etanooli ja RNA sadestati -80°C juures üleöö. RNA sadestamiseks tsentrifuugiti segu 10 min 14000 rpm 4°C juures. RNA sadet pesti 500 µl 70% etanooliga, kuivatati 30°C juures 10 min ja lahustati H<sub>2</sub>O-s. DNAas töödeldud RNA-d säilitati -80°C juures.

cDNA sünteesimiseks kasutati 1,5 µg DNAas-töödeldud RNA-d ja 20 pmol vastassuunalisi praimereid (praimerite järjestused on toodud lisas 2), lisati 15U RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo), 4 µl 5x puhvrit ja 2 µl 10mM dNTP-d. Reaktsioonisegu inkubeeriti 42°C juures 60 min ja reaktsioon peatati 70°C juures 10 min. Sünteesitud cDNA säilitati -20°C juures.

qRT-PCR reaktsioonil kasutati 4 µl cDNA-d (80x lahjendus), 0,6 µl päri- ja vastassuunalisi praimereid (10 pmol/µl) (praimerite järjestused on toodud lisas 2) ja 5 µl 2x qPCR Master Mix-i (Thermo/Fermentas), reaktsioonimahuga kokku 10 µl. Igalt cDNA proovilt määrati ekspresioonitase 3 korduses. Kontrollidena kasutati genoomse DNA asemel destilleeritud vett ning DNAas-töödeldud RNA-d. Kõik amplifikatsioonid viidi läbi aparaadil ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System. Reaktsioonitsükkel koosnes: denaturatsioon 95°C 15 min, amplifikatsioon 40 tsükli: 95°C 15 sek ja 60°C 1 minut. Andmete analüüsil kasutati võrdlevat Ct meetodit (Schmittgen & Livak, 2008). Tulemuste normaliseerimiseks kasutati *housekeeping* geene *UBC6* ja *ARP6*, millel on näidatud stabiilne ekspresioonitase. Katse viidi läbi 2 korduses.

### **3.1.10. Signaaliülekanalite analüüs kasutades reporterplasmidi**

Signaaliülekanalite aktiivsuse analüüsimiseks kasvatati rakke YPD vedelsöötmes 30°C juures kuni OD<sub>600</sub> väärtuseni 0,6-0,8. Seejärel transformeeriti tüvedesse plasmid pRS315, mis sisaldas *LEU2* markergeeni ning reporterplasmid, mis sisaldas *URA3* markergeeni. cAMP-PKA signaaliülekanalite analüüsimisel kasutati reporterplasmidi pLG669-Z *FLO11* 6/7 ning FG MAPK raja analüüsimisel pLG669-Z

*FLO11* 9/10 plasmidi. Need reporterid sisaldavad *CYCI* promootorit, mille keskele on viidud kas cAMP-PKA või FG MAPK raja poolt aktiveeritavad *FLO11* promootori fragmendid ning  $\beta$ -galaktosidaasi geen. Transformatsioon viidi läbi kasutades LiOAc meetodit (Knop jt. 1999) ning kolooniad selekteeriti 30°C juures Sc–Leu–Ura selektiivsöötmele. Rakke kasvatati üleöö Sc–Leu–Ura söötmes, lahjendati OD<sub>600</sub> väärtuseni 0,3-0,4 ning kasvatati 5 tundi logaritmilise kasvufaasini.

15 ml rakke tsentrifugeeriti (Hettich UNIVERSAL 32R) 4°C juures 3 min 3200 rpm ja pesti 4°C 1 ml BB-ga (*Breaking buffer*) (100 mM TrisHCl, 1 mM DDT, 20% glütserool). Rakud külmutati vedelas lämmastikus ja sulatati jääle. Lisati 100  $\mu$ l BB (4°C), 4  $\mu$ l 100 mM PMSF-i (fenüülmetaansulfonüülfluoriid) ja 0,5 mm klaaskuule. Rakud lõhuti vorteksil 3x2 min 4°C juures, lisati 100  $\mu$ l BB, tsentrifugeeriti 14000 rpm 4°C juures 10 min ning saadud valgulüsaat viidi uude *ependorf*<sup>2</sup>i. Lüsaatidest määrati valgu kontsentratsioon OD<sub>590</sub> juures Bradfordin meetodil (Bradford, 1976).

50  $\mu$ l lüsaadile lisati 450  $\mu$ l Z-puhvrit (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 7H<sub>2</sub>O, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – H<sub>2</sub>O, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub> – 7H<sub>2</sub>O, 0,27%  $\beta$ -merkaptotetanool). Segu hoiti 5 min 30°C juures.  $\beta$ -galaktosidaasi reaktsiooni alustati 100  $\mu$ l 4 mg/ml ONPG (orto-nitrofenüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiid) Z-puhvril lahuse lisamisega. Lahuseid hoiti 30°C juures kollase värvuse tekkimiseni. Reaktsioon lõpetati lisades 250  $\mu$ l 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Värvuse intensiivsust mõõdeti OD<sub>420</sub> juures. Lüsaatide  $\beta$ -galaktosidaasi kontsentratsioon arvutati kasutades valemit 1.  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsust (nmol/mg\*min) väljendavad Milleri ühikud (Rose & Botstein, 1983). Katset tehti ühes korduses.

$$\frac{OD_{420} * 1,7}{0,0045 * \text{valgu C} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) * \text{lüsaadi V (ml)} * \text{reaktsiooniaeg (min)}}$$

Valem 1.  $\beta$ -galaktosidaasi kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatud valem (Rose & Botstein, 1983 järgi).

## 3.2. Tulemused

### 3.2.1. Klass III *pet* mutantide konstrueerimine ning nende fenotüübiline analüüs

Mitokondriaalne metabolism ja filamenteerumine on omavahel seotud protsessid. Defektse hingamisahela puhul on häiritud nii filamentne kui ka invasiivne kasv (Lorenz jt., 2000; Kern jt., 2004; Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008). Hingamisahela defektsust võivad põhjustada mutatsioonid tuuma või mitokondriaalses DNA-s (Tzagoloff jt., 1990). *Rho* mutantides kirjeldatud filamenteerumine ja invasiivne kasv erinevad metsiktüübist. Metsiktüüpi rakkudega võrreldes on *rho* mutantide filamendid vähem hargnenud, filamentide moodustumine ja rakkude invaseerumine agarisse toimub vähem efektiivselt (Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008; Aun jt., 2013).

Selleks, et selgitada, kas filamenteerumine ja invasiivne kasv on häiritud ka juhul kui rakkudes on olemas metsiktüüpi mtDNA, kuid hingamisahel ei ole funktsionaalne, saab kasutada Merz ja Westermann, 2009 töös kirjeldatud klass III *pet* geene. Uuritavad geenid valiti eelpool mainitud töös kirjeldatud klass III *pet* geenide seast nii, et kaetud oleksid kõik hingamisahela kompleksid. Töösse valitud geenide funktsioon ja lokalisatsioon rakus on toodud tabelis 3. Katsete tegemisel kasutati kontrollidena metsiktüüpi tüve (*WT, rho<sup>+</sup>*) ja *Δmip1 (rho<sup>o</sup>)* tüve. Mip1 on mitokondriaalne DNA polümeraas ja on vajalik mtDNA säilitamiseks rakkudes (Genga jt., 1986).

Deletsioonitüvede konstrueerimiseks kasutati EUROSCARF deletsioonimutantide kollektiooni tüvesid, milledest olid uuritavad geenid deleteeritud *kanMX6* kassetiga. Vastavad deletsioonikassetid paljundati PCR meetodil ning saadud DNA fragmendid transformeeriti  $\Sigma$ 1278b metsiktüüpi tüvesse. Deletsioonikasseti integreerumist kontrolliti PCR-i reaktsioonil kasutades geenispetsiifilisi ja *kanMX6* kassetile spetsiifilisi primereid.

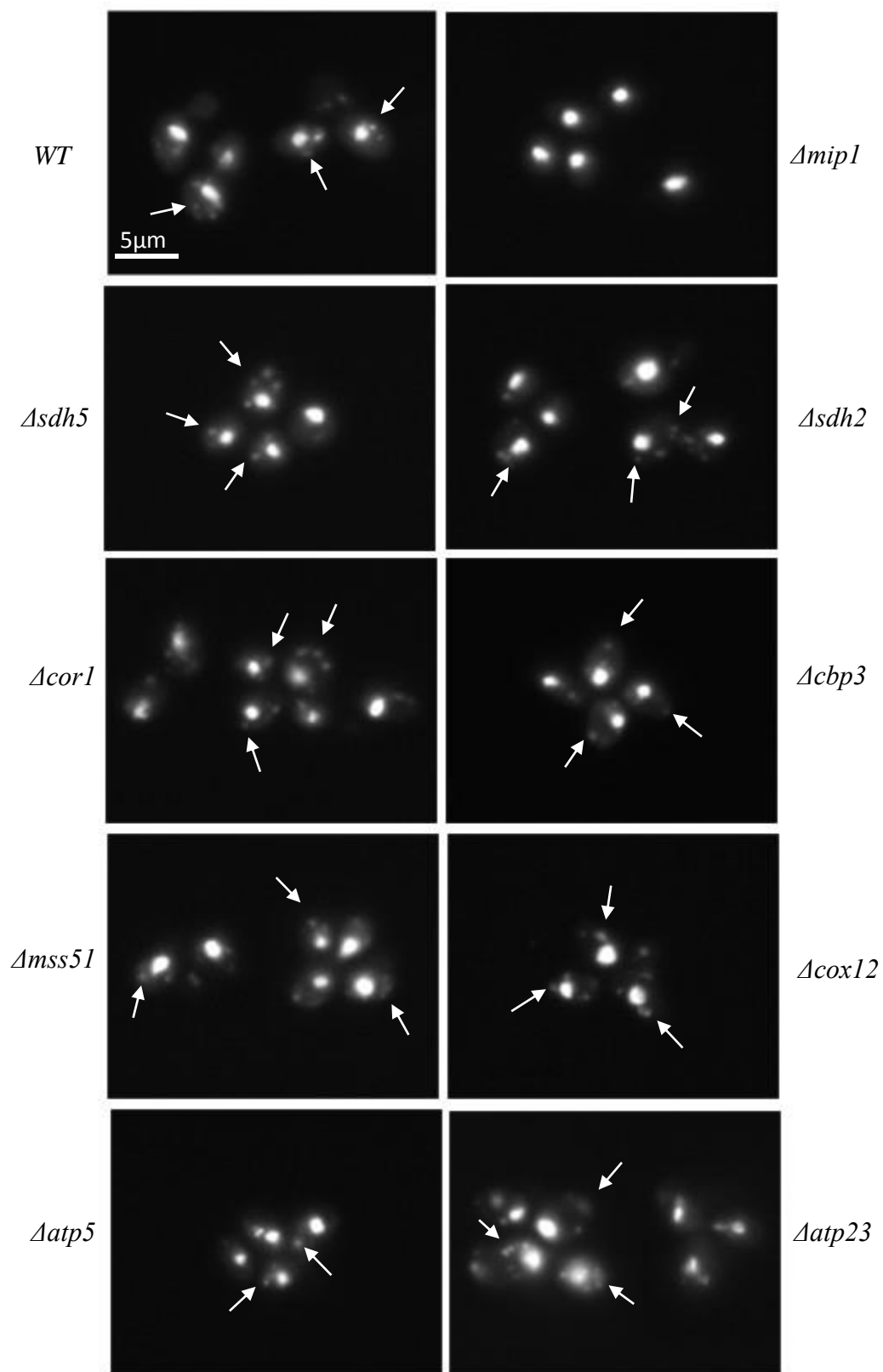
Selleks, et kinnitada konstrueeritud deletsioonimutantide kuuluvust klass III *pet* mutantide hulka, kontrolliti metsiktüüpi mtDNA ja funktsionaalse hingamisahela olemasolu. mtDNA olemasolu rakkudes on võimalik kontrollida rakkude värvimisel DNA-le seonduva fluorestseeruva värviga DAPI. Saadud tulemused on näha joonisel 8.

Metsiktüüpi rakkudes värvus tuumas paiknev DNA ja rakkude perifeerias asuv nukleoididena pakitud mtDNA. Kontrollina kasutati *Δmip1* tüve kus mtDNA puudub. Nendes rakkudes on näha vaid tuuma DNA värvumine. Kõikides deletsioonimutantides

toimus värvumine sarnaselt metsiktüüpi rakkudele, mis kinnitab mtDNA olemasolu rakkudes.

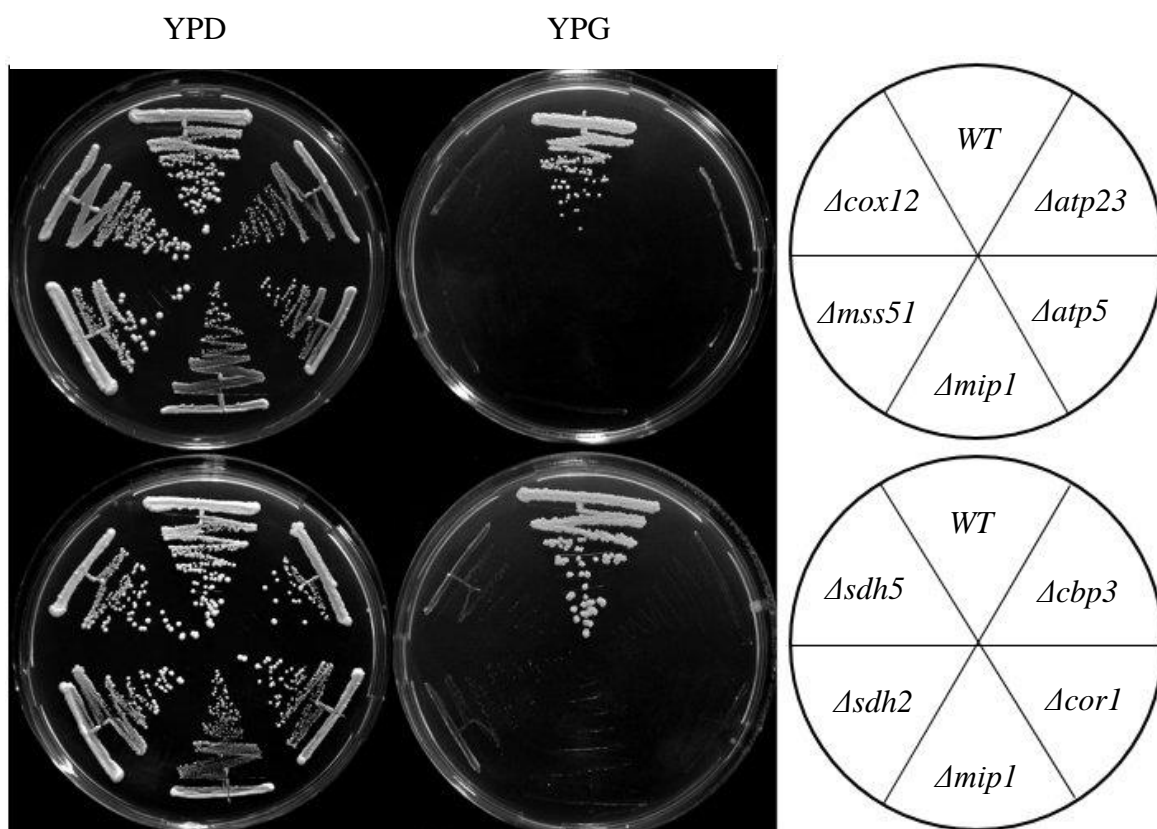
Tabel 3. Geenid, mida kasutati klass III *pet* deletsioonimutantide konstrueerimiseks

Geen	Funktsioon	Lokalisatsioon	Hingamisahela kompleks
<i>SDH2</i>	Suktsinaadi dehüdrogenaasi subühik, Fe-S valk	mitokondri membraan	Kompleks II
<i>SDH5</i>	vajalik suktsinaat dehüdrogenaasi kompleksi kokkupanemisel ning töötamisel	mitokondri maatriks	Kompleks II
<i>COR1</i>	ubikinool-tsütokroom c reduktaasi kompleksi (bc1) subühik	mitokondri sisemembraan	Kompleks III
<i>CBP3</i>	vajalik ubikinool-tsütokroom c reduktaasi kompleksi (bc1) kokkupanekuks, vajalik COB mRNA efektiivseks translatsiooniks	mitokondri membraan	Kompleks III
<i>COX12</i>	Tsütokroom c oksüdaasi subühik VIb, vajalik kompleks IV kokkupanemisel	mitokondri membraanidevaheline ala	Kompleks IV
<i>MSS51</i>	<i>COX1</i> mRNA translatsiooni aktivaator, mõjutab Cox1 seostumist tsütokroom C oksüdaasi kompleksiga	mitokondri sisemembraan	Kompleks IV
<i>ATP5</i>	Mitokondriaalse $F_1F_0$ -ATP süntaasi subühik 5, üks „ <i>stator stalk</i> “ valkudest	mitokondri sisemembraan	Kompleks V
<i>ATP23</i>	Metalloproteaaas, vajalik Atp6 protsessinguks ning $F_1F_0$ -ATP süntaasi $F_0$ kompleksi kokkupakkimisel	mitokondri membraanidevaheline ala	Kompleks V



Joonis 8. Rakkude värvimine DAPI-ga. Rakkudes värvus tuuma DNA ja mtDNA (näidatud noolega). Mõõtjoone pikkus 5  $\mu m$ .

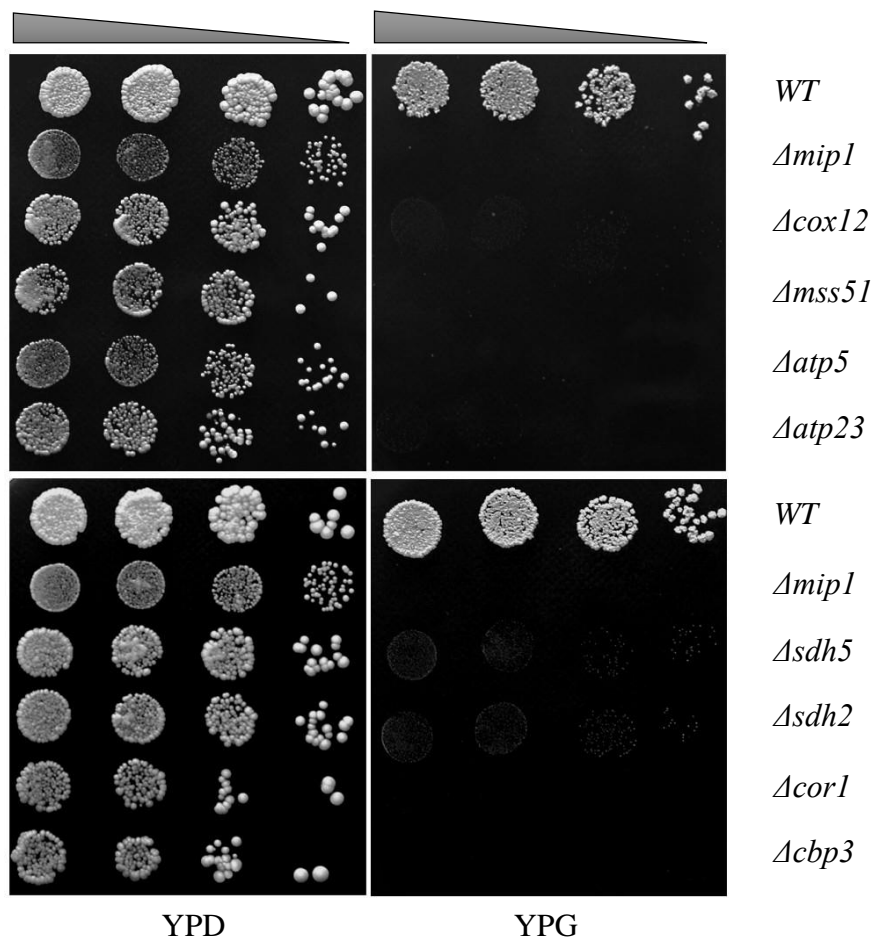
Mittefermenteeritavate süsinikuallikate kasutamine energia tootmiseks vajab funktsionaalset hingamisahelat. Glütserooli kasutamine söötmes glükoosi asemel aitab eristada rakke, milles hingamisahel töötab või on defektne. Deletsioonimutante kasvatati YPD ja YPG tardsöötmetel 2-3 päeva 30°C juures. Saadud tulemused on näidatud joonisel 9.



Joonis 9. Haploidsete rakkude kasv fermenteeritava (YPD, vasakul) ja mittefermenteeritava (YPG, keskel) süsinikuallikaga tardsöötmetel. Rakud külvati tassidele joonkülv meetodil ning kasvatati 30°C juures 2-3 päeva. Paremäl on toodud tüvede paiknemine plaadil.

Metsiktüüpi rakkudes on hingamisahel funktsionaalne ning rakud kasvavad nii fermenteeritaval (YPD) kui ka mittefermenteeritaval (YPG) söötmetel. *Δmip1* tüves on hingamisahel defektne ning rakud kasvavad vaid YPD söötmetel. Tüved *Δcox12*, *Δmss51*, *Δatp23*, *Δatp5*, *Δcbp3* ja *Δcor1* kasvasid sarnaselt *Δmip1* tüvele vaid YPD söötmetel. Tüvede *Δsdh5* ja *Δsdh2* puhul oli näha nõrk kasv ka YPG söötmetel, mis võib olla põhjustatud erineva hulga rakkude külvamisest.

Selle välistamiseks analüüsiti rakkude kasvu YPD ja YPG tardsöötmetel tilk-külv meetodil. Tilk-külv meetod võimaldab külvata iga tüve korral võrdne arv rakke. Saadud tulemused on näidatud joonisel 10.

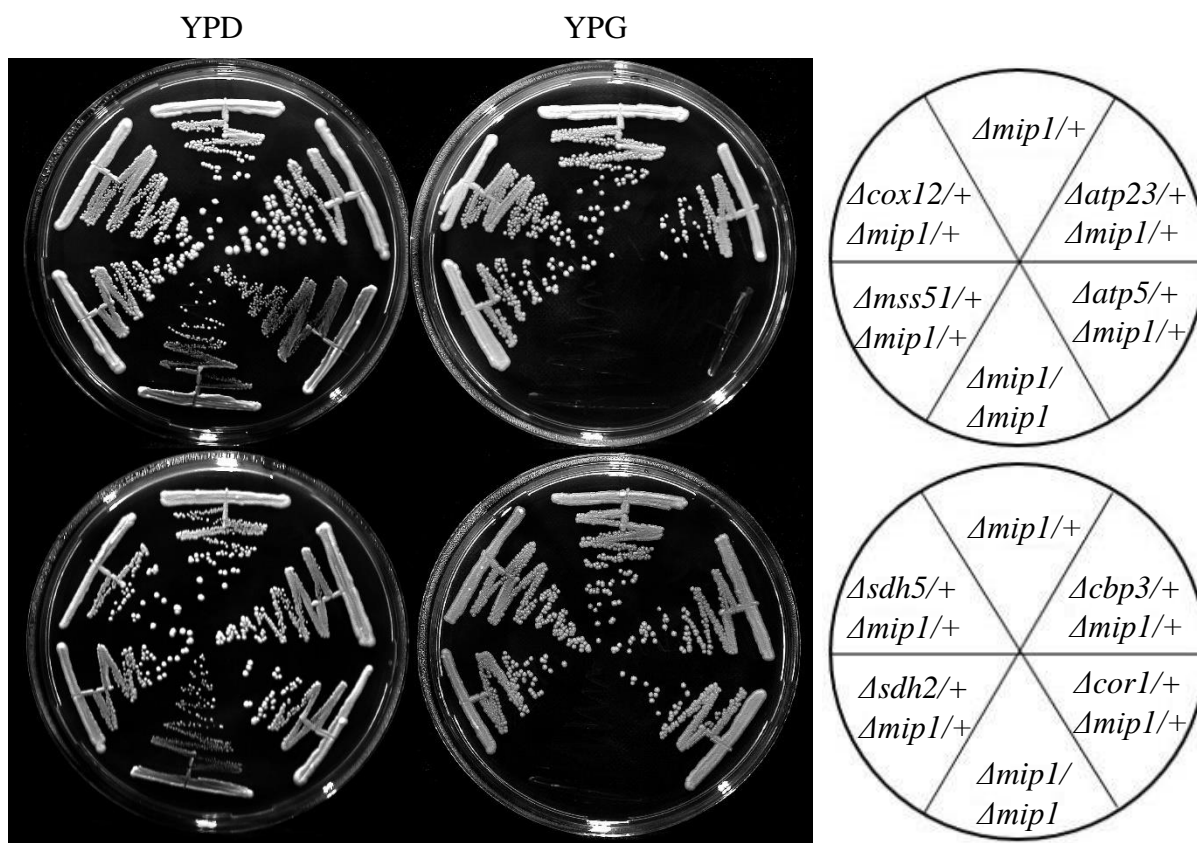


Joonis 10. Tüvede kasvu analüüs. Tilk-külv meetodil külvatud rakkude kasv fermenteeritaval (YPD, vasakul) ja mittefermenteeritaval (YPG, keskel) tardsöötmetel 30°C juures 2-3 päeva. Paremalt on toodud tüvede paiknemine plaadil.

Tüvede *Δsdh5* ja *Δsdh2* puhul oli näha väga nõrka kasvu YPG söötmetel. Rakkude kasvatamisel kuni 7 päeva 30°C juures kolooniad suuremaks ei kasvanud (tulemused ei ole näidatud), mis näitab, et antud tüved ei ole võimelised YPG söötmetel kasvama rohkem kui mõne jagunemise võrra. Lisaks võimaldab tilk-külv meetod hinnata moodustunud kolooniate suurust. *Rho* mutantidele on iseloomulik moodustada võrreldes metsiktüübiga väiksemaid *petite* kolooniaid kasvades fermenteeritavat süsinikuallikat sisaldaval söötmetel (YPD) (Ephrussi jt., 1949; de Zamaroczy jt., 1981). Tüved *Δatp5* ja *Δatp23* kasvavad

sarnaselt  $\Delta mip1$  tüvega, ülejäänud deletsioonimutandid moodustavad  $\Delta mip1$  tüvest suuremaid kolooniaid.

Deletsioonimutantide kasvu puudumine YPG söötmel annab alust eeldada, et neil puudub funktsionaalne hingamisahel. Hingamisahel võib olla defektne kahel põhjusel: rakkudes puudub funktsionaalne mtDNA või esinevad mutatsioonid tuumagenoomis hingamisahelaga seotud geenides. Klass III *pet* mutantide ristamisel  $\Delta mip1$  tüvega saadakse heterosügootsed diploidid, mis suudavad kasvada ka mittefermenteeritavatel süsinikuallikatel, sest nendes rakkudes on olemas metsiktüüpi mtDNA (Merz ja Westermann, 2009). Metsiktüüpi mtDNA olemasolu kontrollimiseks ristati konstrueeritud deletsioonimutandid  $\Delta mip1$  tüvega (SC $\Sigma$ -141, paardumistüüp *Mata*). Saadud heterosügootseid diploide kasvatati YPD ja YPG tardsöötmel 2-3 päeva 30°C juures. Saadud tulemused on näidatud joonisel 11.



Joonis 11. Heterosügootsete diploidsete rakkude kasv fermenteeritava (YPD, vasakul) ja mittefermenteeritava (YPG, keskel) süsinikuallikaga tardsöötmel. Rakke kasvatati 30°C juures 2-3 päeva. Paremalt on toodud tüvede paiknemine plaadil.

Tüvede  $\Delta cox12$ ,  $\Delta mss51$ ,  $\Delta atp23$ ,  $\Delta sdh5$ ,  $\Delta sdh2$ ,  $\Delta cbp3$  ja  $\Delta cor1$  ristamisel  $\Delta mip1$ -ga saadud heterosügootsed diploidid kasvasid sarnaselt metsiktüüpi tüvega nii YPD kui ka YPG söötmel. See näitab, et nendes rakkudes on olemas metsiktüüpi mtDNA.  $\Delta atp5$  ja  $\Delta mip1$  ristamisel saadud diploid ei suutnud kasvada YPG söötmel, samasugune fenotüüp on näha ka  $\Delta mip1$  homosügootsel diploidil. Seega  $\Delta atp5$  rakkudes puudub metsiktüüpi mtDNA.

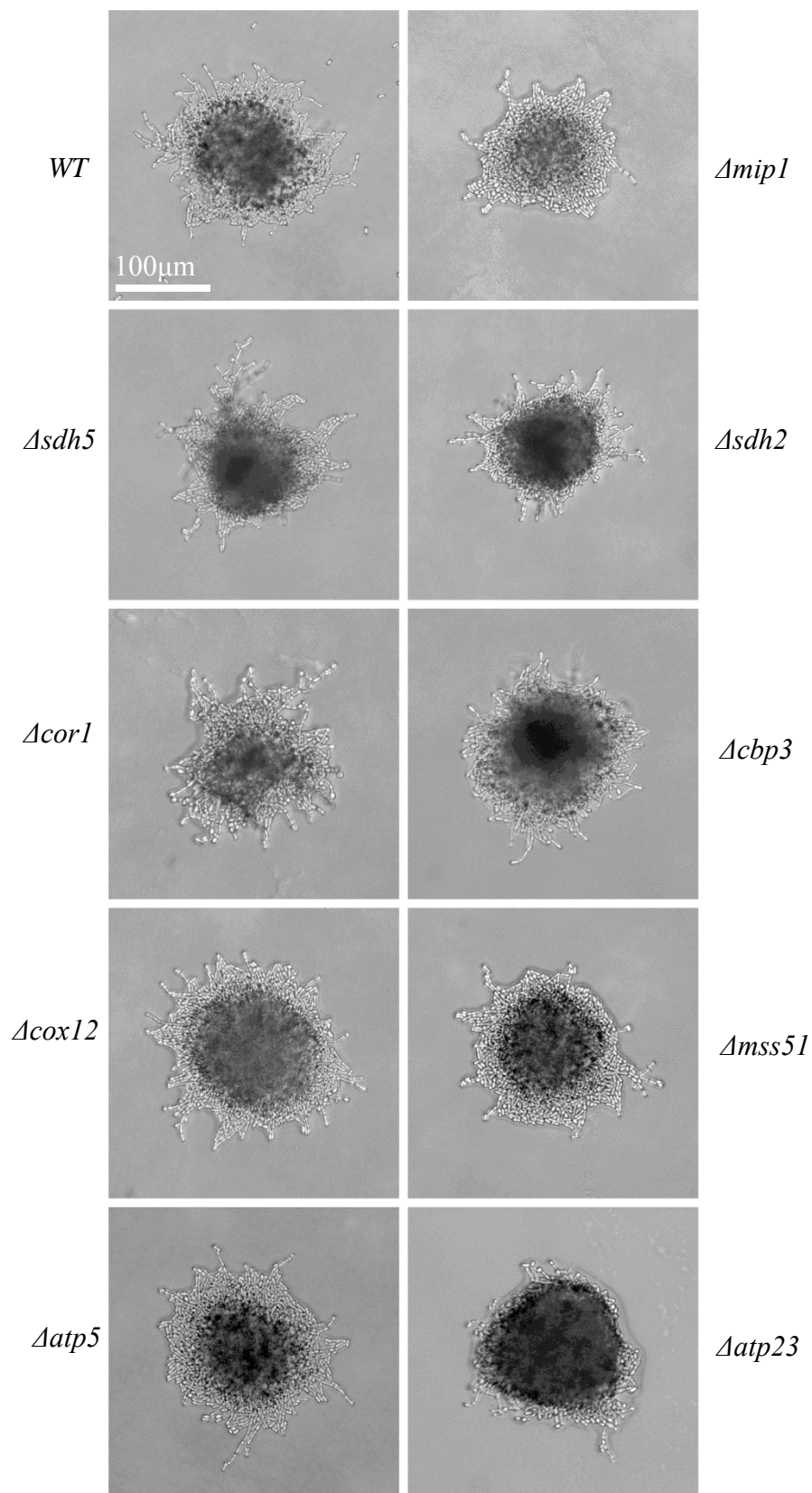
Antud katsete põhjal kuuluvad kõik peale tüve  $\Delta atp5$  klass III *pet* mutantide hulka. Kokkuvõtte töös kasutatud deletsioonimutantide fenotüübilisest analüüsist on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Kokkuvõtte töös kasutatud deletsioonimutantide fenotüüpide analüüsist.

Tüvi	mtDNA olemasolu	Metsiktüüpi mtDNA olemasolu	Funktsionaalne hingamisahel	Kuulumine klass III <i>pet</i> mutantide hulka
$\Delta sdh5$	+	+	-	Jah
$\Delta sdh2$	+	+	-	Jah
$\Delta cor1$	+	+	-	Jah
$\Delta cbp3$	+	+	-	Jah
$\Delta cox12$	+	+	-	Jah
$\Delta mss51$	+	+	-	Jah
$\Delta atp5$	+	-	-	Ei
$\Delta atp23$	+	+	-	Jah

### 3.2.2. Klass III *pet* mutantide filamentne kasv

Lämmastikunäljas muutuvad *S. cerevisiae* rakud piklikumaks ja hakkavad moodustama filamente, kus rakkude pooldumisel toimub tütaraku täielik eraldumine tsütokineesil, kuid rakud jäävad üksteisega kinnitunuks rakukesta valkude abil (Gimeno jt., 1992). *Rho* mutandid muutuvad samuti piklikumaks, kuid nende poolt moodustatud filamendid on lühemad ja hargnevad vähem võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008; Aun jt., 2013).



Joonis 12. Filamentse kasvu analüüs. Rakke kasvatati SLAD + 1% isobutanool söötmel 30°C juures 3-7 päeva. Mõõtjoone pikkus 100 μm.

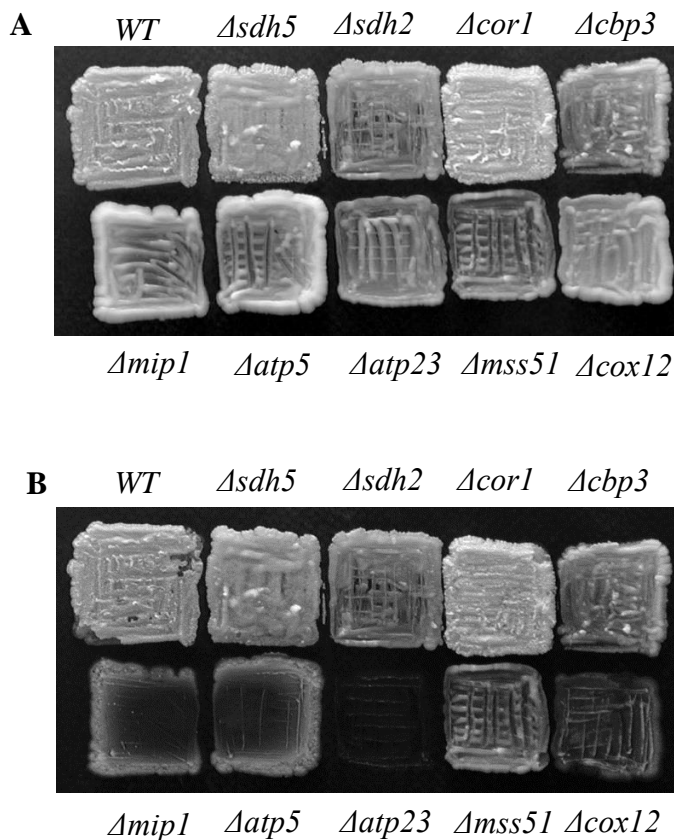
Töös kasutatud deletsioonimutantide filamentse kasvu analüüsimiseks kasvatati rakke 30°C juures 3-7 päeva SLAD tardsöötmele, mis sisaldas 1% isobutanooli. Moodustunud kolooniate filamentne kasv on toodud joonisel 12.

Kontrollidena kasutati metsiktüüpi ja *Amip1* rakke. Metsiktüüpi rakud muutusid kujult piklikumaks ja moodustasid suurel hulgal hargnenud filamente. *Amip1* rakkude kuju muutus samuti piklikumaks, kuid moodustunud filamendid olid vähem hargnenud. Kõikide deletsioonimutantide rakud muutusid 1% isobutanooli sisaldaval SLAD söötmele kujult piklikumaks ja moodustasid filamente. Mutandid *Asdh5*, *Asdh2*, *Acor1* ja *Acbp3* kolooniatest kasvas välja suurel hulgal filamente, mis olid hargnenud sarnaselt metsiktüüpi tüvega. Mutantide *Acox12*, *Amss51* ja *Aatp5* kolooniates moodustunud filamendid olid vähem hargnenud meenutades *Amip1* fenotüüpi. Mutandi *Aatp23* kolooniatel esines üksikuid filamente, mis ei olnud hargnenud.

### 3.2.3. Klass III *pet* mutantide invasiivne kasv

Süsinikuallikate puudumisel on metsiktüüpi rakkudele iseloomulik invaseerumine agarisse. *Rho* mutandid teevad seda vähem efektiivselt võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008; Aun jt., 2013). Invasiivse kasvu analüüsimiseks kasvatati rakke 30°C juures 2-7 päeva YPD tardsöötmele. Rakke vaadeldi ja pildistati enne ja pärast pesu voolava veega. Saadud tulemused on toodud joonisel 13.

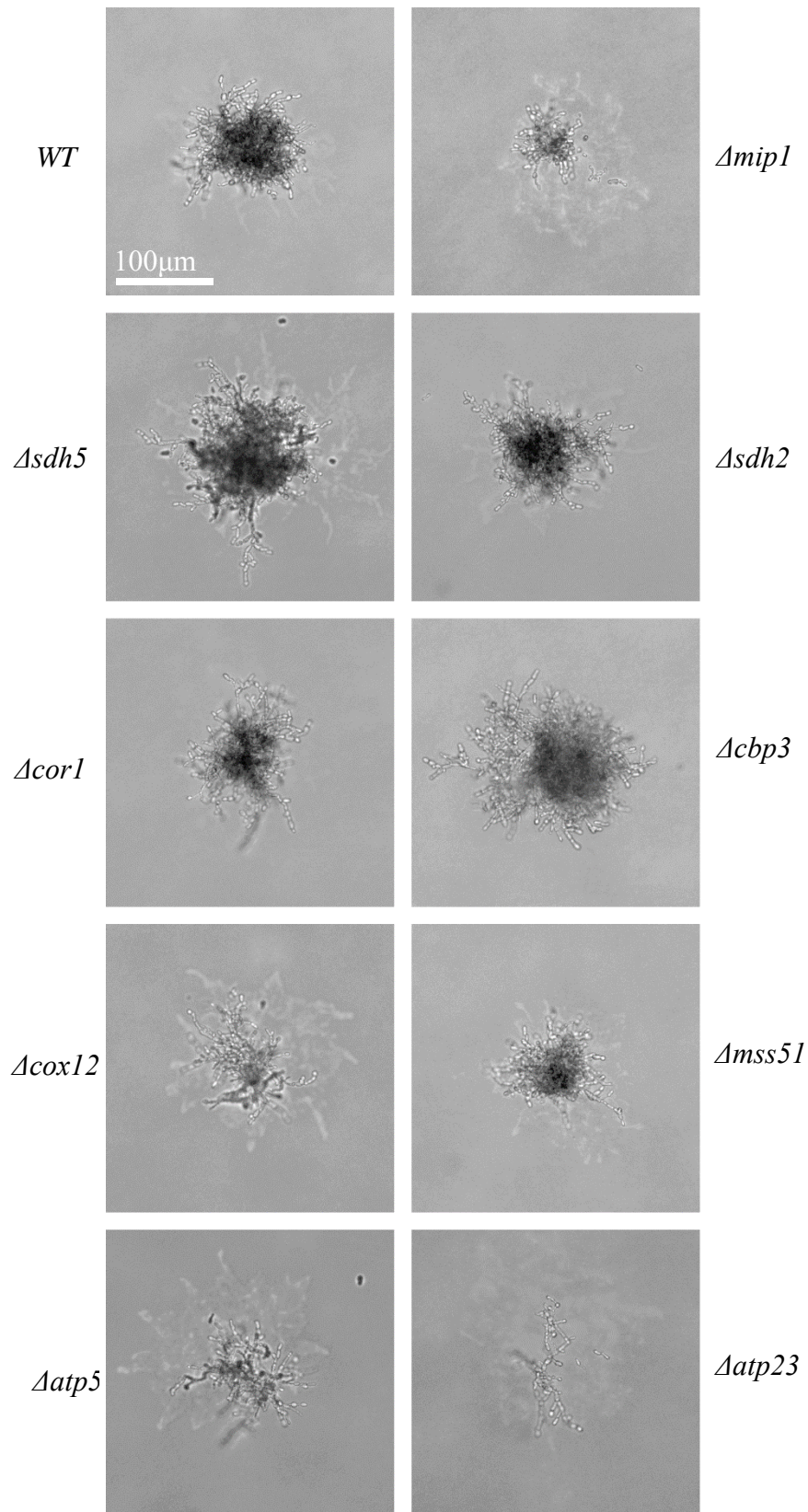
Pesemisel voolava veega jääb metsiktüüpi koloonia agarile alles, mis näitab rakkude invaseerumist agarisse. *Amip1* tüve puhul pestakse enamuse rakke plaadilt maha. Konstrueeritud deletsioonimutantidest invaseerusid agarisse tüved *Asdh5*, *Asdh2*, *Acor1*, *Acbp3* ja *Amss51*. Tüvede *Aatp5* ja *Acox12* invaseerumine agarisse oli sarnane *Amip1* fenotüübiga, kus suurem osa kolooniat moodustavatest rakkudest tuli pesemisel veega agari küljest lahti. *Aatp23* ei olnud võimeline agarile kinnituma.



Joonis 13. Invasiivse kasvu analüüs. Rakke kasvatati YPD söötmel 30°C juures 2-7 päeva. **(A)** Rakkude kasv enne pesu **(B)** Invasiivselt kasvanud rakud pärast pesu.

Invasiivset kasvu on võimalik analüüsida ka SLAD + 1% isobutanool söötmel moodustunud kolooniate pesemisel voolava veega. Ka sel juhul jäävad agarisse kinnitunud rakud alles ning mitteinvasiivsed rakud pestakse plaadilt maha. Saadud tulemused on näidatud joonisel 14.

Metsiktüüpi rakkude pesemisel jäi agarile kinnitunuks ligikaudu pool kolooniast, *Δmip1* rakkude pesemisel oli kinnitunud rakkude arv märgatavalt väiksem. Tüvede *Δsdh5* ja *Δcbp3* puhul invaseerus agarisse suurem osa kolooniast, kui *WT* puhul. Tüvede *Δsdh2* ja *Δcor1* kinnitumine agarile on sarnane metsiktüüpi rakkudele. *Δmss51* invasioon agarisse näitas *WT* ja *Δmip1* tüvedega võrreldes vahepealset fenotüüpi. *Δcox12* ja *Δatp5* kinnitumine agarile oli võrreldav *Δmip1* tüvega, kus peale pesu jäi alles väike osa kolooniast. *Δatp23* puhul invaseerus agarisse vaid loetud arv rakke, praktiliselt kogu koloonia tuli pesul veega agarilt maha.

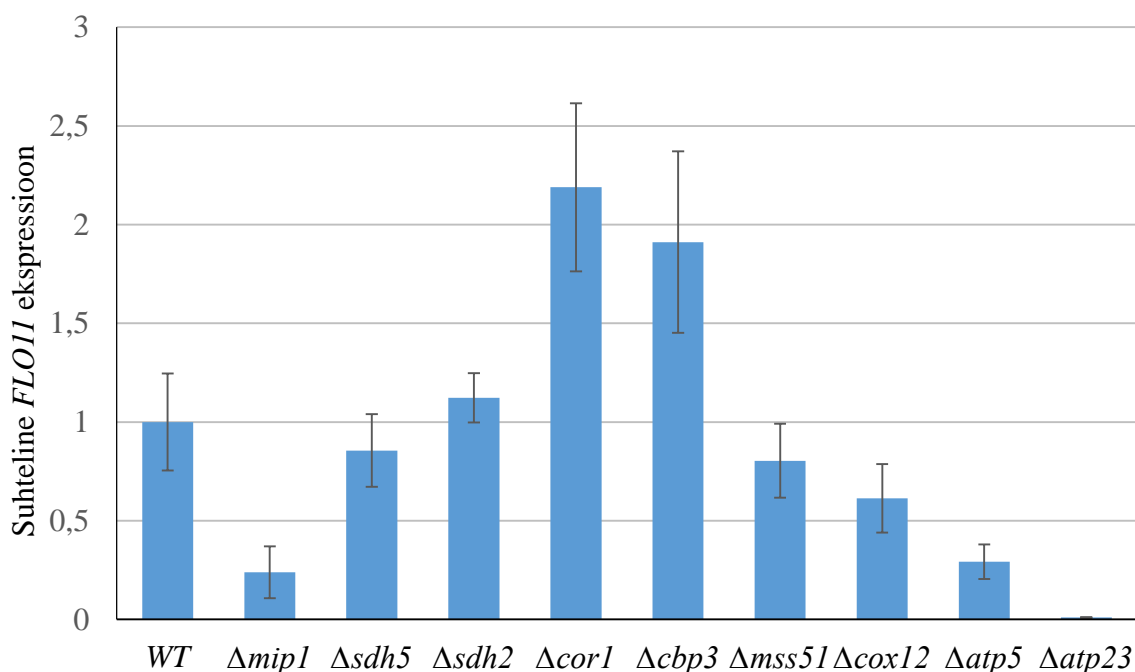


Joonis 14. Filamentselt ja invasiivselt kasvavate rakkude analüüs. Rakke kasvatati SLAD + 1% isobutanool söötmel 30°C juures 3-7 päeva. Kolooniaid pesti voolava veega. Mõõtjoone pikkus 100 μm.

### 3.2.4. *FLO11* ekspressioonitase klass III *pet* mutantides

*FLO11* ekspressioon on vajalik invasiivseks kasvuks (Kuchin jt., 2002; Lo jt., 1996) ja filamentide moodustamiseks (Lambrechts jt., 1996; Lo jt., 1998). *Rho* mutantides on kirjeldatud metsiktüüpi rakkudest madalam *FLO11* ekspressioonitase (Aun jt., 2013).

Ekspressioonitaseme mõõtmiseks kasvatati rakke YPD söötmes logaritmilise kasvufaasini ja analüüsiti qRT-PCR reaktsioonil. Tulemuste normaliseerimiseks kasutati *housekeeping* gene *UBC6* ja *ARP6*. Saadud tulemused on näidatud joonisel 15.



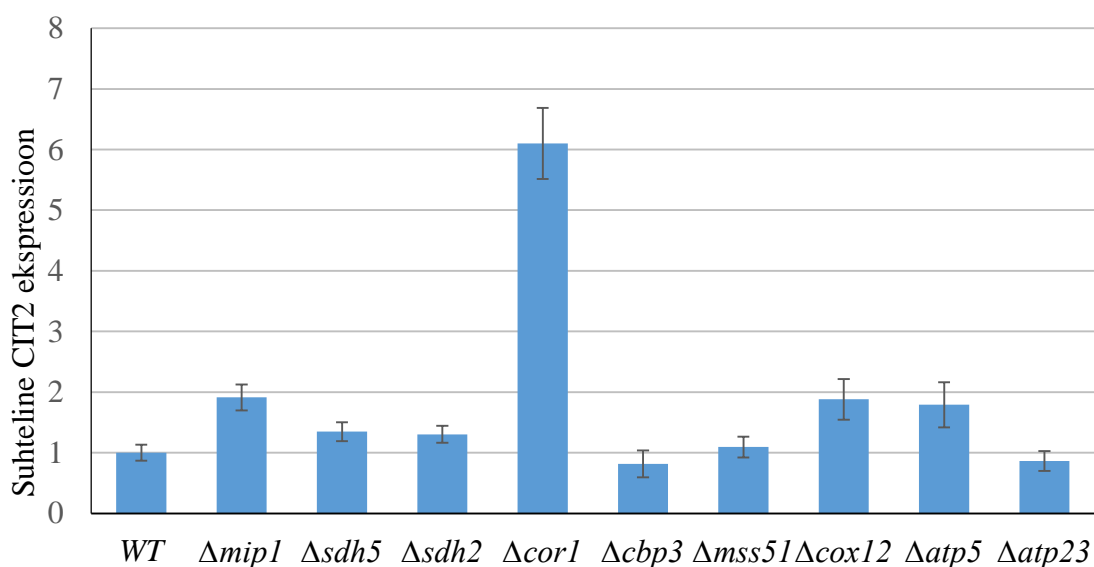
Joonis 15. *FLO11* ekspressioonitase logaritmilises kasvufaasis olevates rakkudes.

Metsiktüüpi rakkude ekspressioonitase on normaliseeritud üheks. Madalam ekspressioonitase (4,35 korda)  $\Delta mip1$  tüves korreleerub varasemalt avaldatud tulemusega (Aun jt., 2013). Deletsioonimutantides  $\Delta sdh5$ ,  $\Delta sdh2$ ,  $\Delta mss51$  on *FLO11* ekspressioonitase samal tasemel metsiktüüpi rakkudega. Tüvedes  $\Delta cor1$  on ekspressioonitase tõusnud 2,19 korda ja tüves  $\Delta cbp3$  1,91 korda. Ekspressioonitase on langenud tüves  $\Delta cox12$  1,64 korda ja tüves  $\Delta atp5$  3,45 korda. Tüves  $\Delta atp23$  jäi *FLO11* ekspressioonitase alla detekteerimispiiri.

### 3.2.5. *CIT2* ekspressioonitase klass III *pet* mutantides

*CIT2* ekspressioonitaseme järgi on võimalik hinnata RTG raja aktiivsust, mis reguleerib lämmastiku ja karbohüdraatide metabolismi rakus. Mittefunktsionaalse mitokondri või lämmastiku nälja puhul RTG rada aktiveeritakse (Liu & Butow, 1999; Chen & Kaiser, 2003; Liu jt., 2001). *Rho* rakkudes on näidatud, et RTG raja aktiveerimist (Liu & Butow, 2006). Rada on aktiivne ka metsiktüüpi rakkudes olles vajalik filamentse ja invasiivse kasvu indutseerimisel (Aun jt., 2013).

Ekspressioonitaseme mõõtmiseks kasvatati rakke YPD söötmes logaritmilise kasvufaasini ja analüüsiti qRT-PCR reaktsioonil. Tulemuste normaliseerimiseks kasutati *housekeeping* geene *UBC6* ja *ARP6*. Saadud tulemused on näidatud joonisel 16.



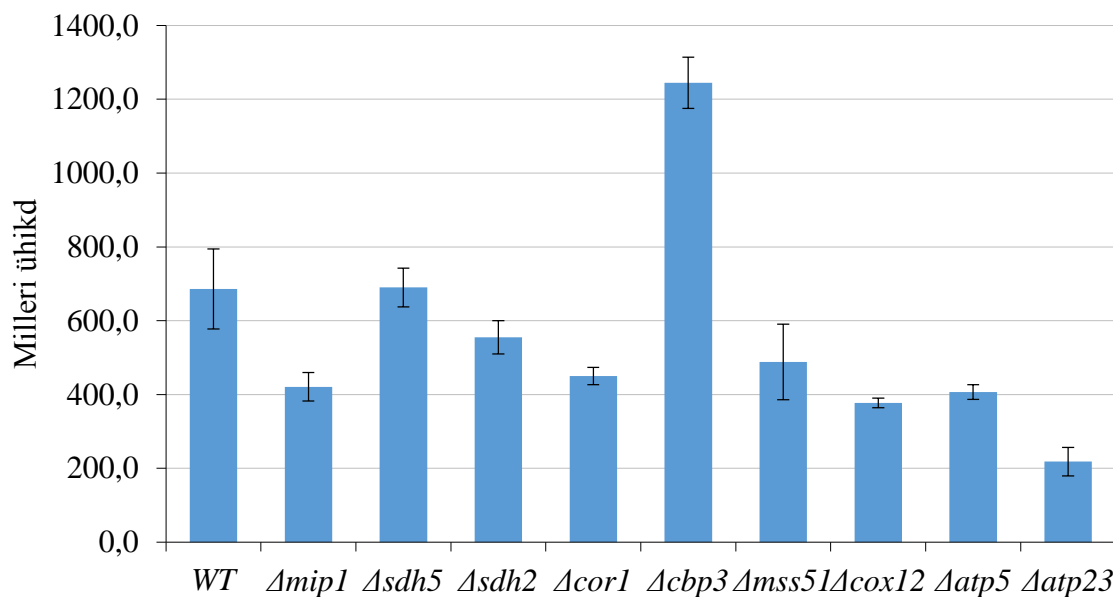
Joonis 16. *CIT2* ekspressioonitase logaritmilises kasvufaasis olevates rakkudes.

Metsiktüüpi rakkude ekspressioonitase on normaliseeritud üheks. Kõrgem ekspressioonitase (1,91 korda)  $\Delta mip1$  tüves korreleerub varasemalt avaldatud tulemusega. Tüvedes  $\Delta sdh5$ ,  $\Delta sdh2$ ,  $\Delta cbp3$ ,  $\Delta mss51$  ja  $\Delta atp23$  oli *CIT2* ekspressioonitase samal tasemel *WT* rakkudega. Tüves  $\Delta cor1$  oli *CIT2* ekspressioonitase tõusnud 6,24 korda. Tüves  $\Delta cox12$  oli ekspressioonitase tõusnud 1,88 korda ja tüves  $\Delta atp5$  1,79 korda, olles samal tasemel  $\Delta mip1$  rakkudega.

### 3.2.6. FG MAPK signaaliülekaneraja aktiivsus klass III *pet* mutantides

Selleks, et selgitada muutusi kirjeldatud *FLO11* ekspressioonitasemes analüüsiti signaaliülekaneradade FG MAPK ja cAMP-PKA aktivatsiooni. Varasemalt on näidatud, et FG MAPK rada on aktiivne nii metsiktüüpi rakkudes kui ka *rho* mutantides. Raja inhibeerimine *TECI* deleteerimisega põhjustab filamenteerumise ja invasiivse kasvu täieliku kadumise mõlemates tüvedes (Aun jt., 2013).

FG MAPK raja aktiivsuse mõõtmiseks kasutati  $\beta$ -galaktosidaasi geenil põhinevat reporterplasmidi, mis sisaldas *CYCI* promootoris viidud FG MAPK raja poolt aktiveeritavat *FLO11* promootori järjestust. Deletsioonitüvedesse transformeeriti plasmid pLG669-Z *FLO11* 9/10. Rakke kasvatati Sc–Leu–Ura söötmes logaritmilise kasvufaasini ning eraldatud valgulüsaadist mõõdeti valgu kontsentratsioon Bradfordin meetodil (Bradford, 1976) ning  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsus (Rose & Botstein, 1983). Tulemused on toodud joonisel 17.



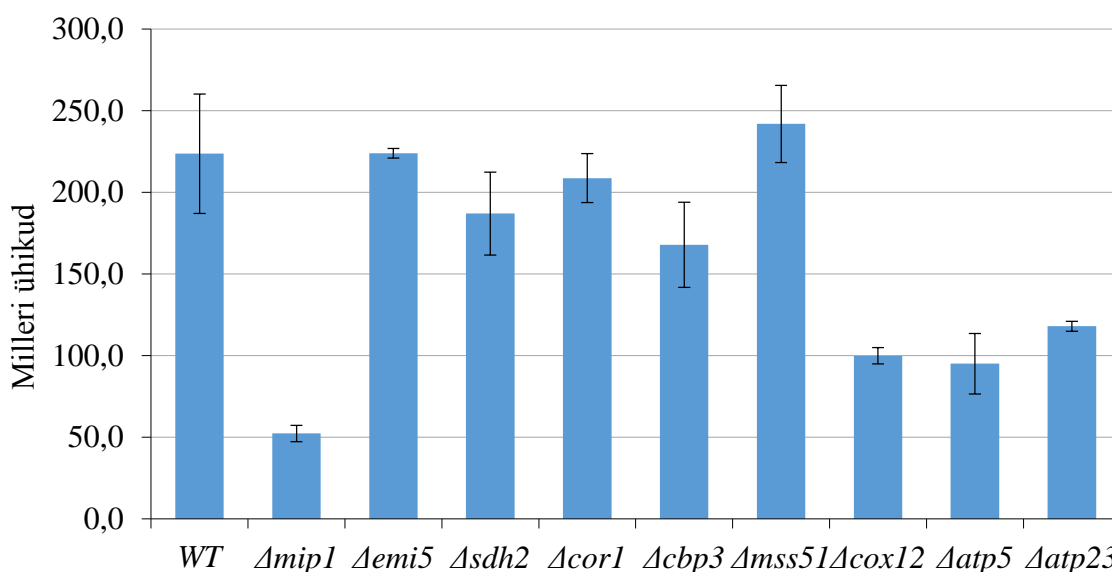
Joonis 17. FG MAPK signaaliülekaneraja aktiivsus logaritmilises kasvufaasis olevates rakkudes.

*Δmip1* raja aktiivsus metsiktüüpi rakkudega võrreldes oli langenud 1,32 korda, mis veapiire arvestades jääb metsiktüüpi rakkude tasemele. Tüvedes *Δsdh5*, *Δsdh2*, *Δcor1* ja *Δmss51* oli FG MAPK raja aktiivsus samal tasemel metsiktüüpi ja *Δmip1* rakkudega.

Tüves *Δcbp3* oli aktiivsus tõusnud 1,81 korda. Tüvedes *Δcox12* oli aktiivsus langenud 1,82 korda, *Δatp5* 1,69 korda ning *Δatp23* 3,15 korda.

### 3.2.7. cAMP-PKA signaaliülekaneraja aktiivsus klass III *pet* mutantides

Varasemalt on näidatud, et cAMP-PKA raja aktiivsus on *rho* mutantides madalam võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Enjalbert jt., 2000; Aun jt., 2010). cAMP-PKA raja aktiivsuse mõõtmiseks kasutati β-galaktosidaasi geenil põhinevat reporterplasmidi, mis sisaldas *CYCI* promootorisse viidud cAMP-PKA raja poolt aktiveeritavat *FLO11* promootori järjestust. Deletsioonitüvedesse transformeeriti plasmiid pLG669-Z *FLO11* 6/7. Rakke kasvatati Sc–Leu–Ura söötmes logaritmilise kasvufaasini ning eraldatud valgulüsaadist mõõdeti valgu kontsentratsioon Bradfordi meetodil (Bradford, 1976) ning β-galaktosidaasi aktiivsus (Rose & Botstein, 1983). Tulemused on toodud joonisel 18.



Joonis 18. cAMP-PKA signaaliülekaneraja aktiivsus logaritmilises kasvufaasis olevates rakkudes.

*Δmip1* rakkudes langes raja aktiivsus 4,28 korda võrreldes metsiktüüpi rakkudega. Tüvedes *Δsdh5*, *Δsdh2*, *Δcor1*, *Δcbp3* ja *Δmss51* oli cAMP-PKA raja aktiivsus samal tasemel metsiktüüpi rakkudega. Tüvedes *Δcox12* oli aktiivsus langenud 2,25 korda, *Δatp5* 2,35 korda ja *Δatp23* 1,9 korda.

#### 4. ARUTELU

mtDNA sisaldab 8 geeni, millelt kodeeritud valgud on olulised mitokondriaalse translatsioonisüsteemi ja hingamisahela funktsioneerimiseks (Foury jt., 1998). Defektid mtDNA-s või selle puudumine on kirjeldatud *rho* mutantides, kus seetõttu puudub funktsionaalne hingamisahel. mtDNA kadu ei ole rakkudele letaalne, kuid põhjustab muutusi rakkude metabolismis. Võrreldes metsiktüüpi rakkudega on *rho* mutantidele muuhulgas iseloomulik aeglasem kasv ning häiritud filamentne ja invasiivne kasv. *Rho* mutantide rakkude kuju muutub filamenteerumisel piklikumaks, kuid nende poolt moodustatud filamendid on lühemad ning hargnevad vähem võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Kang & Jiang, 2005; Jin jt., 2008; Aun jt., 2013).

Mitte kõiki hingamisahela komponentne ei kodeerita mtDNA-lt. Seetõttu võib hingamisahel olla mittefunktsionaalne ka tuumagenoomis paiknevate mutatsioonide tõttu ning selliseid tüvesid kirjeldatakse kui *pet* mutantne. *Pet* mutandid jagatakse nelja klassi. Antud töös oli kasutusel klass III *pet* deletsioonimutandid. Klassi III kuuluvad deletsioonimutandid, mille poolt kodeeritud valgud on hädavajalikud hingamiseks, kuid ei ole vajalikud mtDNA säilitamiseks. Klass III *pet* deletsioonimutantide abil saab uurida üksikute defektsete hingamisahela komplekside mõju filamenteerumisele ja invasiivsele kasvule. Tänu metsiktüüpi mtDNA esinemisele ei ole häiritud teiste komplekside kokkupanek (Merz ja Westermann, 2009).

Töös püstitatud eesmärkide saavutamiseks konstrueeriti 8 klassi III kuuluvat *pet* deletsioonimutanti. Deletsioonimutantide fenotüübilisest analüüsist selgus, et *Δatp5* tüvel puudub metsiktüüpi mtDNA. Ülejäänud 7 konstrueeritud tüve vastasid klass III *pet* geenide klassifikatsioonile ja sobisid töös esitatud eesmärkide analüüsimiseks.

Üksikute defektsete hingamisahela komplekside mõju uurimiseks analüüsiti deletsioonimutantide filamentset ja invasiivset kasvu, *FLO11* ja *CIT2* ekspressioonitaset ning FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekaneradade aktiivsust. Saadud tulemused on kokkuvõtvalt toodud tabelis 5.

Tabel 5. Kokkuvõtte töös analüüsitud klass III *pet* mutantide fenotüüpidest ja signaaliülekaneradade aktivatsioonist.

Tüvi	Filamentne kasv	Invasiivne kasv	<i>FLO11</i> ekspressioonitase	<i>CIT2</i> ekspressioonitase	FG MAPK raja aktiivsus	cAMP-PKA raja aktiivsus
<i>WT</i>	+++	+++	++	+	++	+++
<i>Amip1 (rho<sup>o</sup>)</i>	+	+	+	++	++	+
<i>Δsdh5</i> (kompleks II)	+++	++++	++	+	++	+++
<i>Δsdh2</i> (kompleks II)	+++	+++	++	+	++	+++
<i>Δcor1</i> (kompleks III)	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Δcbp3</i> (kompleks III)	+++	++++	+++	+	+++	+++
<i>Δcox12</i> (kompleks IV)	++	+	+	++	++	+++
<i>Δmss51</i> (kompleks IV)	+	++	++	+	+	++
<i>Δatp5 (rho<sup>-</sup>)</i> (kompleks V)	+	+	+	++	+	++
<i>Δatp23</i> (kompleks V)	-	-	-	+	+	++

Tüvedes *Δsdh5* ja *Δsdh2* on häiritud hingamisahela kompleks II kokkupanek. Mutantides puudub suksinaat dehüdrogenaasi kompleks, mistõttu on rakkudes häiritud suksinaadi oksüdeerumine fumaraadiks ja elektronide ülekande ubikinoonile. Fumaraadi puudumine põhjustab tsitraaditsükli peatumise (Cecchini, 2003). Nendes deletsioonimutantides toimub FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekaneradade aktivatsioon ning filamentne kasv sarnaselt metsiktüübile. Mutandi *Δsdh5* puhul on näha tugevamat invasiivset kasvu võrreldes metsiktüüpi rakkudega. Tugevamat invasiivset kasvu on kirjeldatud ka varasemalt avaldatud Ryan jt., 2012 töös. Tüvedes *Δsdh5* ja *Δsdh2* on *CIT2* ekspressioonitase sarnane metsiktüübi rakkudele, mis näitab, et RTG signaaliülekaneraja aktiivsus on aktiveeritud samal määral metsiktüüpi rakudega. Mittefermentatiivsel süsinikuallikal kasvamise defekti ei põhjusta mittefunktsionaalne hingamisahel, vaid blokk metabolismis.

Tüvedes *Δcbp3* ja *Δcor1* puudub hingamisahela kompleks III. Mutantides puudub funktsionaalne ubikinool-tsütokroom c reduktaasi kompleks, mistõttu häirub elektronide ülekanne O<sub>2</sub>-le ja prootonite pumpamine mitokondri maatriksist välja membraanide vahelisse ruumi. Prootonite gradiendi teke on vajalik ATP sünteesiks ja valkude impordiks mitokondrisse (Gasser jt., 1982; Schleyer jt., 1982). *Rho* rakkudes on prootoni gradiendi teke võimalik ka F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP süntaasi pöörduval toimimisel ATP hüdrolüüsil. Mõlema deletsioonimutandi puhul oli näha metsiktüüpi tüvega võrreldes rohkemate hargnenud filamentide teket, *Δcbp3* rakkudel on märgatavalt efektiivsem invaseerumine agarisse. Samasugused fenotüübid on kirjeldatud ka Ryan jt., 2012. aastal avaldatud töös. Tugevam filamenteerumine ja invasiivne kasv on seotud *FLO11* ekspressioonitaseme tõusuga, mille põhjuste leidmiseks analüüsiti RTG, FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekanderadade aktiivsust. *Δcbp3* rakkudes RTG ja cAMP-PKA raja aktiivsus jäi samale tasemele võrreldes metsiktüüpi rakkudega. FG MAPK raja aktiivsus oli tõusnud 1,81 korda võrreldes metsiktüübiga. FG MAPK raja ühe oluliseima transkriptsioonifaktori Tec1 üleekspressioonil on näidatud samuti invasiivse kasvu tugevnemist (Foster jt., 2013; Shively jt., 2013). *Δcor1* tüves oli FG MAPK ja cAMP-PKA radade aktiivsus sarnane metsiktüübiga. *CIT2* ekspressioonitase oli tõusnud võrreldes metsiktüübiga 6,24 korda, mis näitab, et RTG rada on antud tüves aktiveeritud suuremal määral kui metsiktüüpi rakkudes. RTG signaaliülekanderada on oluline *FLO11* ekspressioonil. Rada aktiveeritakse metsiktüüpi rakkudes lämmastiku nälja korral (Aun jt., 2013) või membraanipotentsiaali langusel (Miceli jt., 2011). RTG raja inaktiveerimine *Artg2* tüvedes põhjustab metsiktüüpi rakkudes filamentse kasvu häirumise invasiivset kasvu mõjutamata (Aun jt., 2013). *Δcor1* tüves on varasemalt näidatud lämmastiku omastamise häirumist (VanderSluis jt., 2014), mis võib tähendada, et rakud tunnetavad pidevat nälga ka kasvades rikkal söötmel.

Tüvedes *Δcox12* ja *Δmss51* on häiritud hingamisahela kompleks IV kokkupanek. See takistab prootonite pumpamist maatriksist välja ja molekulaarse hapniku redutseerimist veeks. Prootongradiendi teke toimub ka kompleksis III, suuremaks probleemiks rakkude jaoks on vabade hapnikuradikaalide teke. Filamentse kasvu analüüsist selgus, et mõlema deletsioonimutandi puhul on vähenenud filamentide moodustumine ja hargnevus. Invaseerumine agarisse on vähenenud oluliselt *Δcox12* puhul ja osaliselt *Δmss51* puhul. *Δcox12* puhul esineb korrelatsioon *FLO11* ekspressioonitaseme ja kirjeldatud fenotüübi vahel. *FLO11* ekspressioonitase on langenud 1,64 korda võrreldes

metsiktüüpi rakkudega, kuid on 2,54 korda kõrgem kui *Δmip1* rakkudes. *CIT2* ekspressioonitase on tõusnud 1,88 korda võrreldes metsiktüüpi rakkudega olles samal tasemel *Δmip1* rakkudega, mis näitab RTG raja aktiveerumist samal määral kui *Δmip1* tüves. FG MAPK ja cAMP-PKA radade analüüsist selgus, et mõlema raja aktiivsus on langenud võrreldes metsiktüübiga. FG MAPK aktiivsus oli 1,82 korda madalam metsiktüübist ja 1,38 korda madalam *Δmip1*-st. cAMP-PKA raja aktiivsus oli 2,25 korda madalam metsiktüübist, kuid 1,91 korda kõrgem *Δmip1*-st. Muutused FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekanalades on tõenäoliselt põhjuseks, miks on rakkudes muutunud filamentne ja invasiivne kasv. *Δmss51* puhul on *FLO11* ekspressioonitase langenud vaid 1,25 korda ning arvestades veapiire jääb samale tasemele metsiktüüpi rakkudega. RTG raja ja cAMP-PKA raja aktiivsus on samuti samal tasemel metsiktüüpi rakkudega. FG MAPK raja puhul on näha vähest langust (1,40 korda). Võimalik, et *Δmss51* rakkudes esinev fenotüüp on põhjustatud muutustest mõnes teises signaaliülekanalajas.

Tüvedes *Δatp5* ja *Δatp23* puudub funktsionaalne hingamisahela kompleks V. Deletsioonimutantide fenotüübilisest analüüsist selgus, et *Δatp5* tüvel puudub metsiktüüpi mtDNA. Tegemist on *rho*<sup>-</sup> mtDNA genoomiga tüvega näidates *rho* mutantidele iseloomulikku fenotüüpi kõigis katsetes. *Δatp23* tüvedes on häiritud F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP süntaasi kokkupanek, mis põhjustab ATP sünteesi häirimise ja muutusi membraanipotentsiaalis. *Rho* mutantide puhul on näidatud küll metsiktüübist madalama, kuid kasvuks piisava membraanipotentsiaali teket ADP/ATP translokaatori Aac2 abil (Dupont jt., 1985). Madalam membraanipotentsiaal on *rho* rakkude aeglasemalt kasvamise põhjuseks (Smith & Thorsness, 2005); Weber jt., 1995). *Δatp23* kolooniate kasv oli sarnane *Δmip1* tüvele sarnaselt Osman jt., 2006 avaldatud töös. Antud deletsioonimutandi fenotüüp oli kõige selgemini eristatav metsiktüüpi rakkudest. Rakud moodustasid väga vähesel määral filamentne ning invasioon agarisse puudus täielikult. *FLO11* ekspressioonitase jäi *Δatp23* puhul alla detekteerimispiiri. *CIT2* ekspressioonitase ei ole võrreldes metsiktüüpi rakkudega muutunud, mis näitab, et RTG rada ei ole aktiveeritud. cAMP-PKA raja aktiivsus oli madalam metsiktüübist 1,9 korda, kuid 2,26 korda kõrgem kui *Δmip1* tüves. Kuna cAMP-PKA rada ei ole inaktiveeritud nii suurel määral, kui seda on näha *Δmip1* tüve puhul (4,28 korda), peab olema kirjeldatud defektne filamenteerumine ja invasiivne kasv ning *FLO11* ekspressiooni puudumine põhjustatud vähemalt osaliselt ka mõnest teisest rajast, milleks võiks olla näiteks FG MAPK signaaliülekanalada. FG MAPK

signaaliülekaneraja aktiivsus oli langenud 3,15 korda võrreldes metsiktüübiga ning 2,39 korda võrreldes *Amip1* tüvega. FG MAPK signaaliülekaneraja inaktiveerimine regulaatori Tec1 deleteerimisel näitab, et *Atec1* tüvedes puudub filamentne ja invasiivne kasv täielikult (Lorenz jt., 2000; Mösch & Fink, 1997; Mösch jt., 1999; Aun jt., 2013).

Antud töö tulemusena leiti, et üks osa klass III *pet* deleteerimutantidest käituvad sarnaselt metsiktüübi rakkudega. Teise osa rakkude fenotüüp oli sarnane *Amip1* tüvega. Tehtud katsetest võib järeldada, et funktsionaalne hingamisahel on eelduseks, et rakkudes toimuks metsiktüüpi filamentteerumine ja invasiivne kasv. Kompleksi II hingamisahela häirumisel on filamentteerumine ja invasiivne kasv sarnane metsiktüüpi rakkudele. Kompleks III puhul toimub filamentne ja invasiivne kasv efektiivsemalt. Kõige olulisemad on hingamisahela kompleksid IV ja V, nende puudumisel on rakkude filamentne ja invasiivne kasv oluliselt häiritud. Neis hingamisahela kompleksides on häiritud membraanipotentsiaali teke ja ATP süntees ning on oht vabade radikaalide tekkimiseks.

## 5. KOKKUVÕTE

Filamentse ja invasiivse kasvu esinemiseks on vajalik funktsionaalse hingamisahela olemasolu. *Rho* mutantides, kus mtDNA on defektne või puudub, on häirunud hingamisahela komplekside III, IV ja V kokkupanek ning suktsinaadi oksüdatsioon fumaradiiks (Zara jt., 2004; Ebner & Schatz, 1973; Schatz jt., 1968). Hingamisahel võib olla defektne ka tuumagenoomis aset leidnud mutatsioonide tõttu (Merz & Westermann, 2009).

Töö eesmärgiks oli leida, kuidas muutuvad filamentne ja invasiivne kasv erinevate hingamisahela komplekside häirumisel. Selleks konstrueeriti 8 klass III *pet* deletsioonimutanti ning analüüsiti nende mutantide filamentset ja invasiivset kasvu, mõõdeti *FLO11* ja *CIT2* ekspressioonitasemeid ning määrati FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekanalade aktiivsus. *Δatp5* fenotüübilisest analüüsist selgus, et neis rakkudes puudub metsiktüüpi mtDNA, tegemist on *rho*<sup>-</sup> tüvega. Ülejäänud 7 konstrueeritud deletsioonimutanti vastasid klass III *pet* mutantide klassifikatsioonile.

Filamentse ja invasiivse kasvu katsetest leiti, et mittefunktsionaalsete hingamisahela komplekside II ja III puhul toimub rakkude filamentne kasv sarnaselt metsiktüüpi rakkudele või veelgi intensiivsemalt. Komplekside IV ja V häirumisel on fenotüüp sarnane *Δmip1*-ga või on filamenteerumine ja invaseerumine agarisse veelgi rohkem pärsitud.

*FLO11* ekspressioonitaseme määramisel qRT-PCR meetodil leiti, et filamentse ja invasiivse kasvu erinevusi selgitab geeniekspressiooni muutus deletsioonimutantides. *FLO11* geeniekspressiooni tase sõltub RTG, FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekanalade aktiivsusest.

*CIT2* ekspressioonitase näitab RTG raja aktiivsust. RTG rada oli kõrgelt aktiveeritud *Δcor1* tüves, *CIT2* ekspressioonitase oli 6,24 korda kõrgem metsiktüübist. Antud tüve puhul põhjustas see efektiivsema filamenteerumise lämmastikunäljas kasvavates rakkudes. Tüves *Δcox12* oli RTG raja aktiivsus samal tasemel *Δmip1* tüvega, mis on ligikaudu 1,9 korda kõrgem kui metsiktüüpi rakkudes. Tüves *Δcox12* oli filamentne kasv osaliselt pärsitud.

FG MAPK ja cAMP-PKA signaaliülekaneradade aktiivsust mõõdeti kasutades  $\beta$ -galaktosidaasi geenil põhinevat reporterplasmidi, mis sisaldas *CYCI* promootoris viidud konkreetse raja poolt aktiveeritavat *FLO11* promootori järjestust. FG MAPK raja tugevam aktiveerumine  $\Delta cbp3$  tüves põhjustas efektiivsema invaseerumise agarisse, mida näitas ka *FLO11* ekspressioonitaseme tõus 1,91 korda võrreldes metsiktüübiga. FG MAPK ja cAMP-PKA radade aktiivsuse langus tüvedes  $\Delta cox12$  ja  $\Delta atp23$  oli põhjuseks, miks invasiivne ja filamentne kasv olid häiritud. Tüves  $\Delta cox12$  oli *FLO11* ekspressioonitase langenud 1,64 korda, tüves  $\Delta atp23$  jäi see alla detekteerimispiiri.

Analüüsid erinevate hingamisahela mittefunktsionaalsete komplekside mõju filamentsele ja invasiivsele kasvule võib järeldada, et kõige olulisemad on hingamisahela kompleksid IV ja V. Neis hingamisahela kompleksides on häiritud membraanipotentsiaali teke ja ATP süntees ning on oht vabade radikaalide tekkimiseks. Nimetatud komplekside puudumisel on rakkude filamentne ja invasiivne kasv oluliselt häiritud.

## **Filamentous and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* class III *pet* mutants**

Katriin Antonov

### **SUMMARY**

For filamentous and invasive growth it is necessary to have functional respiratory chain. In *rho* mutants, who have defective or missing mtDNA, electron transfer is disrupted due to the absence of essential core subunits of Complexes III, IV, V and also have impaired oxidation of succinate to fumarate (Zara et al., 2004; Ebner & Schatz, 1973; Schatz et al., 1968). Respiratory chain may be defective due to mutations in the nuclear genome as well (Merz & Westermann, 2009).

The aim of this study was to find out how filamentous and invasive growth is influenced when respiratory chain complexes are individually disrupted. For this purpose 8 class III *pet* deletion mutants was constructed. Filamentous and invasive growth were analysed, *FLO11* and *CIT2* expression levels were measured and activities of cAMP-PKA and FG MAPK pathways were determined in these mutants. Phenotypic analysis of  $\Delta atp5$  showed that this strain is *rho*<sup>-</sup> containing dysfunctional mtDNA. The remaining seven constructed strains belong to class III *pet* mutants.

Analyses of filamentous and invasive growth in deletion mutants showed that strains with dysfunctional Complexes II and III have similar phenotype to wild type or are more successful in filamentous and invasive growth. Strains with dysfunctional Complexes IV and V have similar phenotype to  $\Delta mip1$  strain or lack filamentous and invasive growth.

Measuring *FLO11* expression levels showed that differences of filamentous and invasive growth and *FLO11* expression levels are correlated. *FLO11* gene expression is dependent on the level of the activities of RTG, FG-MAPK and cAMP-PKA pathways.

*CIT2* expression levels indicate the activity of RTG pathway. RTG pathway was highly activated in  $\Delta cor1$  strain, where *CIT2* expression level was 6.24 times higher than in the wild type cells. This caused stronger filamentous growth on nitrogen limiting media. RTG pathway activity in  $\Delta cox12$  cells was at the same as determined for  $\Delta mip1$ . Filamentous growth of  $\Delta cox12$  strain was partially inhibited.

Activation of FG MAPK pathway in strain *Δcbp3* resulted more efficient invasion to the agar. In *Δcbp3* cells *FLO11* expression levels were 1.91 times higher than in wild-type cells. Decreased activity of FG MAPK and cAMP-PKA pathways in strains *Δcox12* and *Δatp23* was the reason why invasive and filamentous growth were disturbed. In strain *Δcox12* *FLO11* expression level was decreased 1.64 times when compared to wild type cells and in strain *Δatp23* it remained below the detection limit.

The analyses of filamentous and invasive growth of dysfunctional complexes of the respiratory chain indicated that the most stronger effect is caused by the inactivation of the complexes IV and V. In these mutants disruption of respiratory chain causes decrease of mitochondrial membrane potential and disruption of ATP synthesis.

## **TÄNUAVALDUSED**

Soovin tänada oma juhendajat Tiina Tamme väga hea juhendamise eest. Igakülgne toetus ja kasulikud õpetussõnad muutsid käesoleva uurimistöö valmimise äärmiselt meeldivaks ja õpetlikuks kogemuseks.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams BG (1972). Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics of induction and glucose effects. *Journal of Bacteriology* **111(2)**: 308-15
- Allan JR (1939). Industrial Hygiene Codes. *American Journal of Public Health* **29(7)**: 748–751
- Aun A, Tamm T, Sedman J (2013). Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193(2)**: 467-81
- Aun A (2014). Mitochondria as integraal modulators of cellular signaling. *Dissertationes Biologicae Universitatis Tartuensis* **266**: 17
- Bauer FF, Govender P, Bester MC (2010). Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88(1)**: 31-39
- Bardwell L (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26(2)**: 339–350
- Bidard F, Blondin B, Dequin S, Vezinhet F, P. Barre P (1994). Cloning and analysis of a FLO5 flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Current Genetics* **25**: 196-201
- Boeckstaens M, André B, Marini AM (2008). Distinct transport mechanisms in yeast ammonium transport/sensor proteins of the Mep/Amt/Rh family and impact on filamentation. *Journal of Biological Chemistry* **283(31)**: 21362-70
- Bradford MM (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 248-54
- Braus GH, Grundmann O, Brückner S, Mösch HU (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **14(10)**: 4272-84
- Brückner S, Köhler T, Braus GH, Heise B, Bolte M, Mösch HU (2004). Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Current Genetics* **46(6)**: 331-42
- Brückner S, Mösch HU (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **36(1)**: 25-58
- Casalone E, Barberio C, Cappellini L, Polsinelli M (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Research in Microbiology* **156(2)**: 191-200

- Cecchini G (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry* **72**: 77-109
- Chavel CA, Dionne HM, Birkaya B, Joshi J, Cullen PJ (2010). Multiple signals converge on a differentiation MAPK pathway. *PLoS Genetics* **6(3)**: 1-15
- Chelstowska A, Liu Z, Jia Y, Amberg D, Butow RA (1999). Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast* **15(13)**: 1377-91
- Chen EJ, Kaiser CA (2003). LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *The Journal of Cell Biology* **161(2)**: 333-47
- Cortes MB, Moreno JJ, Zea L, Moyano L, Medina M (1999). Response of the aroma fraction in sherry wines subjected to accelerated biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47(8)**: 3297-302
- Cullen PJ, Sprague GF Jr (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *PNAS* **97(25)**: 13619-24.
- Cullen PJ, Sprague GF Jr (2012). The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. *Genetics* **190**: 23-49
- Cullen PJ, Sabbagh W Jr, Graham E, Irick MM, van Olden EK, Neal C, Delrow J, Bardwell L, Sprague GF Jr (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes & Development* **18(14)**: 1695-708.
- Deminoff SJ, Howard SC, Hester A, Warner S, Herman PK (2006). Using substrate-binding variants of the cAMP-dependent protein kinase to identify novel targets and a kinase domain important for substrate interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **173(4)**: 1909-17.
- Devaux F, Carvajal E, Moye-Rowley S, Jacq C (2002). Genome-wide studies on the nuclear PDR3-controlled response to mitochondrial dysfunction in yeast. *FEBS Letters* **515(1-3)**: 25-8
- Dilova I, Chen CY, Powers T (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Current Biology* **12**: 389-395.
- Dupont CH, Mazat JP, Guerin B (1985). The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from rho+ and rho degree strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **132(3)**: 1116-23
- Ebner E, Schatz G (1973). Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. 3. A nuclear mutant lacking mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* **248(15)**: 5379-84

- Enjalbert B, Parrou JL, Vincent O, François J (2000). Mitochondrial respiratory mutants of *Saccharomyces cerevisiae* accumulate glycogen and readily mobilize it in a glucose-depleted medium. *Microbiology* **146(10)**: 2685-94
- Ephrussi B, Hottinguer H, Chimenes Y (1949). Action de l'acriflavine sur les levures. *Annales de l'Institut Pasteur* **76**: 351–367
- Epstein CB, Waddle JA, Hale W, Dave V, Thornton J, Macatee TL, Garner HR, Butow RA (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of the Cell* **12(2)**: 297-308
- Freiberg KJ, Cruess WV (1955). A study of certain factors affecting the growth of flor yeast. *Applied Microbiology* **3(4)**: 208-12
- Foury F (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* **264(34)**: 20552-60
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **440(3)**: 325-31
- Foster HA, Cui M, Naveenathayalan A, Unden H, Schwanbeck R, Höfken T (2013). The Zinc Cluster Protein Sut1 Contributes to Filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **12(2)**: 244-253
- Gasser SM, Ohashi A, Daum G, Böhni PC, Gibson J, Reid GA, Yonetani T, Schatz G (1982). Imported mitochondrial proteins cytochrome b2 and cytochrome c1 are processed in two steps. *PNAS* **79(2)**: 267–271
- Genga A, Bianchi L, Foury F (1986). A nuclear mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mitochondrial DNA replication and polymerase activity. *The Journal of Biological Chemistry* **261(20)**: 9328-32
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68(6)**: 1077-90.
- Goldring ES, Grossman LI, Krupnick D, Cryer DR, Marmur J (1970). The petite mutation in yeast: loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *The Journal of Molecular Biology* **52**: 323-335.
- Goossens KVY, Stassen C, Stals I, Donohue DS, Devreese B, De Greve H, Willaert RG (2011). The N-Terminal Domain of the Flo1 Flocculation Protein from *Saccharomyces cerevisiae* Binds Specifically to Mannose Carbohydrates. *Eukaryotic Cell* **10(1)**: 110–117
- Granek JA, Magwene PM (2010). Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast. *PLoS Genetics* **6(1)**: 1-12

- Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *PNAS* **97(22)**: 12158-63.
- Halme A, Bumgarner S, Styles C, Fink GR (2004). Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116(3)**: 405-15.
- Hallstrom TC, Moye-Rowley WS (2000). Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **275(48)**: 37347-56
- Hatefi Y (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* **54**: 1015–1069
- Hohl LA, Cruess WV (1938). Observations on certain film forming yeast. *Zentr Bakt Parasitenk Infek* **101**: 65-78
- Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraburttu K, Simon J, Bard M, Friend SH (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **102(1)**: 109-26
- Javadekar VS, Sivaraman H, Sainkar SR, Khan MI (2000). A mannose-binding protein from the cell surface of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3528): its role in flocculation. *Yeast* **16(2)**: 99-110
- Jia Y, Rothermel B, Thornton J, Butow RA (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Molecular and Cellular Biology* **17(3)**: 1110-7
- Jin R, Dobry CJ, McCown PJ, Kumar A (2008). Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Molecular Biology of the Cell* **19(1)**: 284-96
- Johnston M (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends in Genetics* **15(1)**: 29-33
- Kang CM, Jiang YW (2005). Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast* **22(2)**: 79-90
- Kataoka T, Powers S, McGill C, Fasano O, Strathern J, Broach J, Wigler M (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell* **37(2)**: 437-45.
- Kern K, Nunn CD, Pichova A, Dickinson JR (2004). Isoamyl alcohol-induced morphological change in *Saccharomyces cerevisiae* involves increases in mitochondria and cell wall chitin content. *FEMS Yeast Research* **5(1)**: 43-9

- Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, Nasmyth K, Schiebel E (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972.
- Kobayashi O, Yoshimoto H, Stone H (1999). Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **36(5)**: 256-61
- Kuchin S, Vyas VK, Carlson M (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **22(12)**: 3994-4000.
- Kübler E, Mösch HU, Rupp S, Lisanti MP (1997). Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **272(33)**: 20321-3.
- Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *PNAS* **93(16)**: 8419-24.
- Leberer E, Wu C, Leeuw T, Fourest-Lieuvain A, Segall JE, Thomas DY (1997). Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *The EMBO Journal* **16(1)**: 83-97
- Liu H, Styles CA, Fink GR (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144(3)**: 967-78
- Liu Z, Butow RA (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Molecular and Cellular Biology* **(10)**: 6720-8
- Liu Z, Sekito T, Epstein CB, Butow RA (2001). RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *The EMBO Journal* **20(24)**: 7209-19
- Liu Z, Spirek T, Thornton J, Butow RA (2005). A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCFGrr1. *Molecular Biology of the Cell* **16(10)**: 4893-904
- Liu Z, Butow RA (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annual Review of Genetics* **40**: 159-85
- de Llanos R, Llopis S, Molero G, Querol A, Gil C, Fernández-Espinar MT (2004). In vivo virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. *International Journal of Food Microbiology* **144(3)**: 393-9
- Lo WS, Dranginis AM (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *Journal of Bacteriology* **178(24)**: 7144-51.

- Lo WS, Dranginis AM (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **9(1)**: 161-71
- Lorenz MC, Cutler NS, Heitman J (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* (1): 183-99
- Löoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* **50(5)**: 325-328.
- Madhani HD, Fink GR (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275(5304)**: 1314-7
- Malcher M, Schladebeck S, Mösch HU (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187(3)**: 717-30.
- Martinez P, Codon AC, Perez L, Benitez T (1995). Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* **11(14)**: 1399-411
- Meeusen S, Nunnari J (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *The Journal of Cell Biology* **163(3)**: 503-10
- Merz S, Westermann B (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology* **10(9)**: R95
- Miceli MV, Jiang JC, Tiwari A, Rodriguez-Quiñones JF, Jazwinski SM (2011). Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan. *Frontiers Genetics* **2**: 102
- Miki BL, Poon NH, Seligy VL (1982). Repression and induction of flocculation interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **150(2)**: 890-9
- Mortimer RK, Johnston JR (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113(1)**: 35-43
- Mösch HU, Roberts RL, Fink GR (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **93(11)**: 5352-6.
- Mösch HU, Fink GR (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145(3)**: 671-84
- Mösch HU, Kübler E, Krappmann S, Fink GR, Braus GH (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **10(5)**: 1325-35

- Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T (2006). Prohibitins Interact Genetically with Atp23, a Novel Processing Peptidase and Chaperone for the F1FO-ATP Synthase. *Molecular Biology of the Cell* **18(2)**: 627-635
- Pan X, Heitman J (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **19(7)**: 4874-4887
- Peter M, Neiman AM, Park HO, van Lohuizen M, Herskowitz I (1996). Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *The EMBO Journal* **15(24)**: 7046-59
- Pfeifer K, Kim KS, Kogan S, Guarente L (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell* **56(2)**: 291-301
- Reynolds TB, Fink GR (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291(5505)**: 878-81.
- Roberts RL, Fink GR (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development* **8(24)**: 2974-85
- Robertson LS, Fink GR (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *PNAS* **95(23)**: 13783-7.
- Rose M, Botstein D (1983). Structure and function of the yeast URA3 gene. Differentially regulated expression of hybrid beta-galactosidase from overlapping coding sequences in yeast. *Journal of Molecular Biology* **170(4)**: 883-904
- Roy A, Lu CF, Marykwas DL, Lipke PN, Kurjan J (1991). The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 4196-4206
- Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H, Fink G (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *The EMBO Journal* **18(5)**: 1257-69.
- Schatz G (1968). Impaired binding of mitochondrial adenosine triphosphatase in the cytoplasmic "petite" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **243(9)**: 2192-9
- Schleyer M, Schmidt B, Neupert W (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **125(1)**: 109-16
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**: 1101 - 1108

- Sedman T, Kuusk S, Kivi S, Sedman J (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **20(5)**: 1816-24
- Sekito T, Thornton J, Butow RA (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Molecular Biology of the Cell* **11(6)**: 2103-15
- Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular Cell* **40(2)**: 310-22.
- Shively CA, Eckwahl MJ, Dobry CJ, Mellacheruvu D, Nesvizhskii A, Kumar A (2013). Genetic Networks Inducing Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae* Identified Through Systematic Genome-Wide Overexpression. *Genetics* **193 (4)**: 1297-1310
- Smith CP, Thorsness PE (2005). Formation of an energized inner membrane in mitochondria with a gamma-deficient F1-ATPase. *Eukaryotic Cell* **4(12)**: 2078-86
- Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, Vences MD, Jansen A, Prevost MC, Latgé JP, Fink GR, Foster KR, Verstrepen KJ (2008). FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* **135(4)**: 726-37
- Soares EV, Seynaeve J (2000). The use of succinic acid, as pH buffer, expands the potentialities of utilization of a chemically defined medium in *Saccharomyces cerevisiae* flocculation studies. *Biotechnology Letters* **22**: 859-863
- Stratford M (1989). Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **5**: S441-5
- Sudbery PE (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews. Microbiology* **9(10)**: 737-48
- Teunissen AWRH, Holub E, van der Hucht J, van den Berg JA, Steensma HY (1993). Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 423-427.
- Thevelein JM, Beullens M, Honshoven F, Hoebbeck G, Detremmerie K, Griewel B, den Hollander JA, Jans AW (1987). Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by a transient drop in the intracellular pH. *Journal of General Microbiology* **133(8)**: 2197-205.
- Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40(1)**: 27-36.

- Traven A, Wong JM, Xu D, Sopta M, Ingles CJ (2001). Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial dna mutant. *The Journal of Biological Chemistry* **276(6)**: 4020-7
- Van Mulders SE, Christianen E, Saerns SM, Daenen L, Verbelen PJ, Willaert R, Verstrepen KJ, Delvaux FR (2009). *FEMS Yeast Research* **9(2)**: 178-90
- VanderSluis B, Hess DC, Pesyna C, Krumholz EW, Syed T, Szappanos B, Nislow C, Papp B, Troyanskaya OG, Myers CL, Caudy AA (2014). Broad metabolic sensitivity profiling of aprototrophic yeast deletion collection. *Genome Biology* **15**: R64
- Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch HU, Essen LO (2010). *PNAS* **107(52)**: 22511–22516
- Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR (2004). Origins of variation in the fungal cell surface. *Nature Reviews. Microbiology* **2(7)**: 533-40
- Vyas VK, Kuchin S, Berkey CD, Carlson M (2003). Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Molecular and Cellular Biology* **23(4)**: 1341-8.
- Wang JL, Chen C (2006). Cation (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) release in Zn(II) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Huan Jing Ke Xue* **27(11)**: 2261-7.
- Weber ER, Rooks RS, Shafer KS, Chase JW, Thorsness PE (1995). Mutations in the mitochondrial ATP synthase gamma subunit suppress a slow-growth phenotype of yme1 yeast lacking mitochondrial DNA. *Genetics* **140(2)**: 435-42
- Wheeler RT, Kupiec M, Mahnelli P, Abeijon C, Fink GR (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with increased virulence. *PNAS* **100**: 2766-2770
- Yamashita T, Nakamaru-Ogiso E, Miyoshi H, Matsuno-Yagi A, Yagi T (2007). Roles of bound quinone in the single subunit NADH-quinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 6012–6020
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual Review of Genetics* **42**: 27-81.
- de Zamaroczy M, Marotta R, Faugeron-Fonty G, Goursot R, Mangin M, Baldacci G, Bernardi G (1981). The origins of replication of the yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity. *Nature* **292**: 75 – 78
- Zara V, Palmisano I, Conte L, Trumpower BL (2004). Further insights into the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome b. *European Journal of Biochemistry* **271(6)**: 1209-18

Zara S, Bakalinsky AT, Zara G, Pirino G, Demontis MA, Budroni M (2005). FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **71(6)**: 2934-9

Zeitlinger J, Simon I, Harbison CT, Hannett NM, Volkert TL, Fink GR, Young RA (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113(3)**: 395-404

Zhang M, Bennett D, Erdman SE (2002). Maintenance of Mating Cell Integrity Requires the Adhesin Fig2p. *Eukaryotic cell* **5**: 811–822

## LISAD

### Lisa 1. Deletsioonitüvede konstrueerimiseks kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus (5'→3')
SDH5_DEL_FORW	GAAGAGAAGGAGCGACATTATGCTGTTTC
SDH5_DEL_REV	CTCTTGAAGGGTTTTGATGGTGCAACAAC
SDH5_CHECK_FORW	GTACTACAGCTATCTATTGGTCCGAC
SDH2_DEL_FORW	GTAGCTCCGCACGACCATGCCTTAG
SDH2_DEL_REV	GGAATGTGTGAGAATGGTGAGTTTCG
SDH2_CHECK_FORW	CTCAATCCGAATACTTCATTCCCATCAG
COR1_DEL_FORW	AAAGGCCTACAGCGCTCCCTAACCG
COR1_DEL_REV	TCGATAGTTCTTCAGGATCTTGGTCAC
COR1_CHECK_FORW	CAACTACAAATCTGGGGTAAAGTCCGAC
CBP3_DEL_FORW	CCATTCAGGGCGTCTGACTGGAGTTG
CBP3_DEL_REV	GTTCAATCCATGTGCGAATTGATTGACGC
CBP3_CHECK_FORW	GTCATGTTTCAGGCTATGGGATAAGTTC
COX12_DEL_FORW	CAGAAATGCGTCGCGCGTAGTTTTGCC
COX12_DEL_REV	CTCCATCATGAACATTCGTTAGCGTATG
COX12_CHECK_FORW	GCTACCGATTCGTGGGACATGTGTTTC
MSS51_DEL_FORW	GTTCTGGTGTGCGTGTGTGCTCGTCTTG
MSS51_DEL_REV	GATATGTCATGGCAACTGTAGTCAGTATAC
MSS51_CHECK_FORW	CTCTTGCAATGGGAGGCATTGTAGTG
ATP5_DEL_FORW	GACACTTTCGAGAGACGGTGCTGGC
ATP5_DEL_REV	GGCAATGTCTCCGACTTCCCACGTTTG
ATP5_CHECK_FORW	CTTTCCCGTAAGATCTGGCTGCAAACC
ATP23_DEL_FORW	GCCTACAACAATATCGTACCTATTTGAGCAAT
ATP23_DEL_REV	CATCCTGCAACTGTTCTGTGGAGCTA
ATP23_CHECK_FORW	CTTGTTAGGATGAGCAGATTCACTAG
pFa6A check	CTCGACATCATCTGCCAGATG
pYM check	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG

## Lisa 2. qRT-PCR reaktsioonis kasutatud praimerid

Praimer	Järjestus 5'→3'
RT_UBC6_forward	CAGGAAAATGTAGAGACATTAGAAAAGAG
RT_UBC6_reverse	GCTTGTTTCAGCGCGTATTCTGTC
RT_ARP6_forward	ACTACAAAGGCAATTACCCACAGATTG
RT_ARP6_reverse	CGGGACCATGCTCATAGTATTCTTC
RT_FLO11_forward	TATACTGCATGATATTTTGCTGGTCC
RT_FLO11_reverse	TATTTGGTCCTTTTCGCTTCTATTTAAC
RT_CIT2_forward	AAATGATGACTACTCTAAAGATACGATCG
RT_CIT2_reverse	TCATAATCTGGAAAATGGTCCATGGC

## **LIHTLITSENTS**

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina \_\_\_\_\_ Katriin Antonov (27.09.1989) \_\_\_\_\_

(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

Saccharomyces cerevisiae klass III pet mutantide filamenteerumine ja invasiivne kasv,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ vanemteadur Tiina Tamm (PhD) \_\_\_\_\_,

(*juhendaja nimi*)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 31.05.2018 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015