

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Kaarel Kruuse

**Mittefunktsionaalse mitokondri mõju *Saccharomyces cerevisiae*
matja struktuuriga kolooniate kasvule**

Magistritöö

Juhendaja PhD Tiina Tamm

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitokonder ja mitokondriaalne DNA	7
1.2 <i>S. cerevisiae</i> mitmerakuline kasv	8
1.3 <i>S. cerevisiae</i> mitmerakulist kasvu mõjutavad signaaliülekanerajad	9
1.3.1 Mitogeeni poolt aktiveeritud proteiinkinaas rada	9
1.3.2 Retrograadne signaaliülekanerada	10
1.3.3 Tsükliline adenosiinmonofosfaadi - proteiinkinaas A rada	11
1.3.4 Rim101 rada	12
1.4 Filamentne kasv	13
1.5 <i>S. cerevisiae</i> libisev kasv	14
1.6 Rakupinna adhesiin Flo11	15
1.7 <i>S. cerevisiae</i> hüper- ja hüpomatja struktuuriga kolooniad	17
1.8 pH ja glükoosi kontsentratsiooni mõju matja struktuuriga koloonia moodustumisele	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1 Töö eesmärk	19
2.2 Materjal ja meetodika	19
2.2.1 Töös kasutatud tüved	19
2.2.2 Töös kasutatud söötmed ja kasvutingimused	21
2.2.3 Pagaripärmi libiseva kasvu analüüs	21

2.2.4 Deletsioonitüvede konstrueerimine	22
2.2.5 Totaalse RNA eraldamine ja qRT-PCR.....	23
2.3 Tulemused.....	25
2.3.1 Pagaripärmi <i>rho</i> -mutantide ja metsiktüüpi tüvede matja kasvu analüüs	25
2.3.2 Metsiktüüpi ja <i>rho</i> -mutantide matja struktuuriga kolooniate kasv ajas.....	28
2.3.3 pH mõju matja struktuuriga koloonia kasvule	31
2.3.4 Defektsete signaaliülekanalite mõju pagaripärmi libisevale kasvule..	33
2.3.5 Geneetilised interaktsioonid hüpermatjat kasvu põhjustavate deletsioonimutantide ja <i>rho</i> -mutantide vahel.....	36
2.3.6 Mitokondriaalse membraanipotentsiaali mõju <i>rho</i> -mutantide matja struktuuriga koloonia kasvule	40
2.3.7 <i>FLO11</i> , <i>CIT2</i> , <i>NRG1</i> ja <i>SMP1</i> ekspressioon matja struktuuriga koloonia ääres ning keskel	42
2.4 Arutelu	44
KOKKUVÕTE	48
SUMMARY	50
TÄNUAVALDUSED	51
KIRJANDUSE LEOTELU	52
LISAD.....	57
Lisa 1. Töös kasutatud praimerid deletsioonitüvede konstrueerimiseks	57
Lisa 2. Töös kasutatud qRT-PCR praimerid.....	58
Lisa 3. Metsiktüüpi ja <i>rho</i> -mutantide matja kasvu analüüs 5. päeval.....	59
Lisa 4. ATP1-111 mutatsiooni mõju <i>rho</i> ⁺ , <i>rho</i> ⁻ ja <i>rho</i> ⁰ tüvede 5 päeva kasvanud majatele kolooniatele	60

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	61
--	----

KASUTATUD LÜHENDID

AH- aminohape

bp – aluspaar (*base pair*)

cAMP-PKA – tsükline adenosiinmonofosfaadi – proteiinkinaas A

ECM- ekstratsellulaarne maatriks (*extracellular matrix*)

GPI- glükofosfatidüülinositool

MAPK – mitogeeni poolt aktiveeritud proteiinkinaas

mtDNA – mitokondriaalne DNA

PS – Pindalade suhe (*biofilm score*)

qRT-PCR – kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

ROS- reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

rpm – pööret minutis

RTG- retrograadne signaaliülekanerada (*retrograde signaling pathway*)

ori- replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*)

WT – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on laialt levinud mudelorganism metabooslete- ja regulaatorsete radade uurimiseks, sest enamus neid radasid on kõrgelt konserveerunud. Pagaripärmi genoom sekveneeriti 1996. aastal ning see oli ühtlasi esimene sekveneeritud eükarüootne genoom (Goffeau jt., 1996). Pagaripärmi teeb atraktiivseks uurimisobjektiks võime kasvada nii diploidi kui haploidina, ühe- ja mitmerakulise kasvuvormina ning taluda mutatsioone mitokondriaalses DNA (mtDNA)või selle puudumist.

Biofilm on võõrale pinnale kinnitunud mikroorganismide kogum, mille tulemusena moodustub mitmerakuline struktuur. Biofilm võib moodustuda nii elusale kui ka elutule pinnale ja seda esineb kõikjal, näiteks reostusena tööstuses või meditsiiniseadmetel. Biofilmi moodustumise uurimine võimaldab avastada uusi võimalusi seenpatogeenidega ja seente poolt põhjustatud reostusega võitlemisel. Ka *S. cerevisiae* on võimeline kinnituma erinevatele pindadele, näiteks plastikule. Lisaks suudab pagaripärm moodustada kompleksseid matjaid struktuure (ingl. k. *mat formation*), mis tekivad “libiseva kasvu” tulemusena poolvedelatel söötmetel.

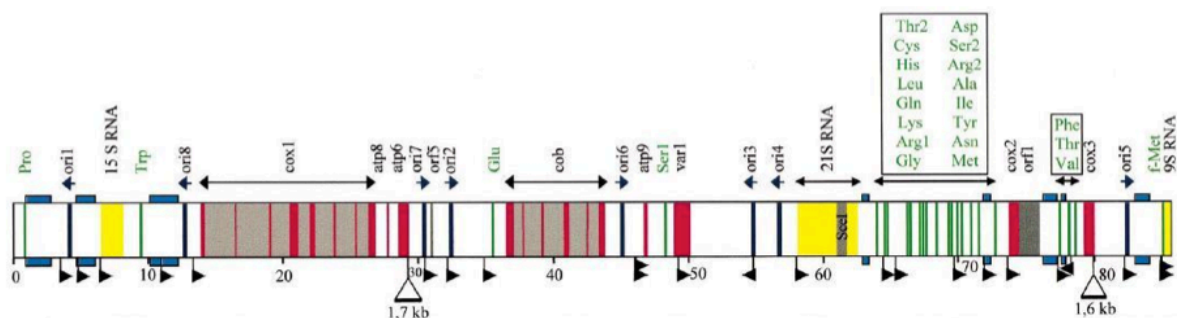
Selle töö eesmärk on uurida *S. cerevisiae* mittefunktsionaalse mitokondriaga mutantide libiseva kasvu fenotüüpi ja defektse matja kasvuga kolooniate tekke põhjuseid analüüsides mitmerakulist kasvu mõjutavaid signaaliülekannderadu.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* mitokonder ja mitokondriaalne DNA

Mitokonder on fosfolipiidse kaksikkihiga eraldatud organell. Tema peamine ülesanne on keemilise energia (ATP) tootmine oksüdatiivse fosforüleerimise tulemusena. Lisaks on mitokonder raku suurim Ca^{2+} hoidla, seal algab Fe-S klastreid sisaldavate valkude biosüntees. Ta osaleb rakutsüki- ja rakujaguemise kontrollis ning rakusiseses signaaliüleandes (McBride jt., 2006).

S. cerevisiae mitokonder omab eraldiseisvat genoomi, mis on olenevalt tüvest 75-85 kiloaluspaari (bp ingl. k. *base pair*) pikk (Foury jt., 1998). Mitokondri sisemembraanil asub oksüdatiivse fosforüleerimise aparaat, mille olulisi komponente kodeeritakse mtDNA-lt. Mitokondri genoom sisaldab tsütokroom c kolme subühiku (I, II, III) geene (vastavalt *COX1*, *COX2* ja *COX3*), ATPaasi subühiku geene 6, 8 ja 9 (*ATP6*, *ATP8*, *ATP9*), apotsütokroom b (*CYTb*) ja ribosomaalse valgu (*VARI*) geene (Joonis 1). Lisaks sellele kodeeritakse mtDNA-lt mitmeid 21S ja 15S ribosomaalseid RNA-sid, 24 tRNA molekuli ja 9S RNA molekuli. MtDNA sisaldab seitset kuni kaheksat replikatsiooni *origin* piirkonda, millest aktiivseteks peetakse kolme kuni nelja- nendelt toimub replikatsiooni initsiatsioon (de Zamaroczy ja Bernardi, 1986). MtDNA defektsed tüved on võimelised kasvama ainult fermenteeritavat süsinikuallikat sisaldaval söötmel ning sellisel juhul saab rakk kogu energia tsütoplasmas toimuva glükolüüsi näol (Ephrussi jt., 1955).



Joonis 1. *S. cerevisiae* tüve FY1679 mitokondriaalse genoomi lineariseeritud kaart. Punased- valku kodeerivate geenide eksonid; kollased- 9S, 15S ja 21S rRNA-d; hallid- intronid; tumesinised- *ori* järjestused; rohelistes- tRNA-d (Foury jt., 1998).

Mitokondriaalse DNA olemasolu järgi jaotatakse *S. cerevisiae* rakud kolme klassi: metsiktüüpi mtDNA-ga ρ^+ rakud, ρ^- rakud, mille mtDNA on alles osaliselt ja ρ^0 rakud, milles mtDNA puudub täielikult. ρ^- ja ρ^0 tüved moodustavad fermenteeritaval süsinikuallikal ρ^+ tüvedest tunduvalt väiksemad *petite* kolooniad, kuna neil puudub funktsioneeriv hingamisahel (Dujon, 1981).

MtDNA osaline või täielik puudumine mõjutab tugevalt raku elutegevust. *Rho*-mutantides suureneb reaktiivsete hapnikuühendite (ROS ingl. k. *reactive oxygen species*) teke, aktiveeritakse retrograadne signaaliülekanal (RTG ingl. k. *retrograde signaling pathway*), mis mõjutab süsiniku- ja lämmastikuühendite metabolismi ning geeniekspressiooni kogu rakus (Liu ja Butow, 2006).

1.2 *S. cerevisiae* mitmerakuline kasv

Pagaripärm on võimeline kasvama nii ühe- kui ka mitmerakulise kasvuvormina. Lülitus erinevate kasvuvormide vahel toimub ühe raku tasandil, et valida kõige optimaalsem tee paljunemiseks ja toitainete omastamiseks. Vedelkultuuris elav üksik pärmirakk ja mitmerakulised agregaadid erinevad teineteisest väga oluliselt. Näiteks *S. cerevisiae* flokuleerunud koloonia on tunduvalt resistentsem erinevatele stressidele kui üksik rakk (Brückner ja Mösch 2011).

Laboris kasutatavad pärmitüved kasvavad enamasti üherakulistena. Looduslikud tüved esinevad komplekssete kolooniatena (Palkova ja Vachova, 2006). Levinumateks kompleksseteks koloonia vormideks on biofilm või libisev kasv ja filamentne kasv. Lisaks esineb veel flokulatsioon ja flotatsioon, millel on tööstuslik tähtsus.

S288C laboritüvi on laialdaselt kasutusel referentstüvena, sest tema genoom on sekveneeritud ning deletsioonimutantide kollektsoon BY4741 kommertsiaalselt kättesaadav. Tüve S288C rakud ei moodusta pseudohüüfe. See tüvi ei ole sobilik ka mitokondriaalset DNA-d uurivate katsete läbiviimiseks, sest tema *MIP1* alleelne variant tõstab *petite* kolooniate sagedust (Mortimer ja Johnston, 1986). Biofilmi ja pseudohüüfse kasvu uurimiseks kasutatakse üldjuhul tüve $\Sigma 1278b$, kus ekspresseeruvad adhesiooniks vajalikud adhesiinid (Granek ja Magwene, 2010).

Pagaripärmi mitmerakulisi agregaatide kirjeldati esmakordselt 1883. aastal (Hansen, 1883). Mitmerakulise koloonia tekke võti on rakkude “kleepumine”

teineteisega ja pindadele. Selleks omab pärm raku pinnal suurt komplekti valke, mida nimetatakse adhesiinideks. Täna on kirjeldatud vähemalt 8 adhesiini: Flo1, Flo5, Flo9, Flo10, Flo11 (Muc1), Fig2 ja Aga1 (Dranginis jt., 2007). On näidatud, et adhesiooniks agariga on olulised Flo10, Flo11 ja Fig2, kuid nende täpne toimemehhanism pole teada (Van Mulders jt., 2009). Libisevaks kasvuks poolvedelatel söötmetel on absoluutselt essentsiaalne Flo11 (Reynold ja Fink., 2001).

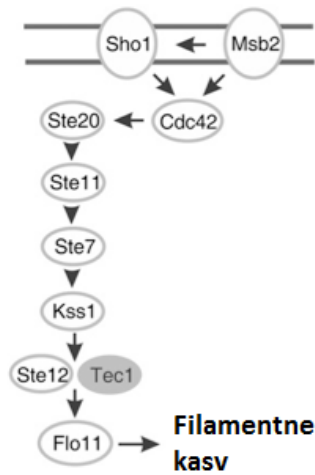
1.3 *S. cerevisiae* mitmerakulist kasvu mõjutavad

signaaliülekanterajad

Signaaliülekanne algab siis, kui signaalmolekul aktiveerib retseptori, mis mõjutab rakusiseseid molekule tekitama vastust. Vastust toitaivate olemasolule ja mitmerakulise agregadi tekkele vahendab suur hulk erinevaid konserveerunud signaaliülekanterajasid. Käesolevas töös uuriti mitogeeni poolt aktiveeritud proteiinkinaasi (MAPK), retrograadset (RTG), tsükilise adenosiinmonofosfaatproteiinkinaas A (cAMP-PKA) ning Rim101 signaaliülekanterajasid.

1.3.1 Mitogeeni poolt aktiveeritud proteiinkinaas rada

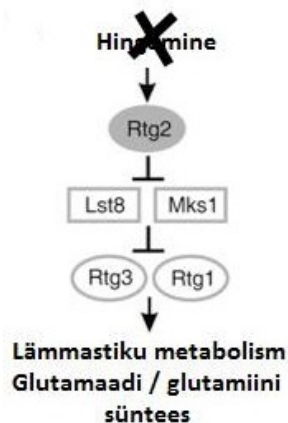
Mitogeeni poolt aktiveeritud proteiinkinaasi (MAPK ingl. *k mitogen activated protein kinase*) rada kutsutakse ka kui filamentse kasvu rada. Kaskaadi aktiveerib rakupinna glükoproteiin Msb2 ja osmosensor Sho1 (Cullen jt., 2000). Kaskaadi aktiveerib kinaas Ste20 ja hõlmab kinaase Ste11, Ste7 ja MAPK rajale iseloomulikke kinaasi Kss1. Need aktiveerivad transkriptsioonifaktorid Ste12 ja Tec1 (Joonis 2). Ste12 on transkriptsioonifaktor ka feromooni äratundmisrajas, mis on oluline paardumiseks. Tec1 on essentsiaalne filamentseks kasvuks. MAPK rajas seostuvad Ste12 ja Tec1 *FLO11* promooterpiirkonna TCS elemendile aktiveerides *FLO11* ekspressiooni. MAPK rada on aktiivne ka mtDNA defektsetes *S. cerevisiae* tüvedes (Aun jt. 2012).



Joonis 2. Filamentse kasvu MAPK signaaliülekanerada. Kaskaadi aktiveerib rakupinna glükoproteiin Msb2 ja osmosensor Sho1, kinaasid Ste20, Ste11, Ste7 ja Kss1 aktiveerivad transkriptsioonifaktorid Ste12 ja Tec1, mis mõjutavad Flo11 ekspressiooni (Aun jt., 2010 järgi).

1.3.2 Retrograadne signaaliülekanerada

Retrograadne signaaliülekanerada (RTG ingl. k. *retrograde signalling pathway*) reguleerib lämmastiku ja karbohüdraatide metabolismi. Kui rakud kasvavad lämmastiku defitsiidis vastutab nimetatud rada α -ketoglutaradi sünteesi eest, mis on glutamaadi eellasmolekul (Smets jt., 2010). Samuti on rada aktiveeritud juhul, kui mitokondri genoom on defektne või puudub (Liu ja Butow, 2006). Raja sensoriks on tsütoplasma valk, positiivne regulaator Rtg2, mis seondub Mks1-ga ja fosforüleerib selle. Seejärel eemalduvad inhibiitorid Lst8 ja Mks1 Rtg1-Rtg3 transkriptsiooniaktivaatoritelt ja viimased translokeeruvad tuuma ning seonduvad GTCAC järjestustele sihtmärkgeenide promooteritel, mis avaldub nende geenide ekspressioonitaseme tõusuna (Sekito jt., 2000; Chavel jt., 2010) (Joonis 3). RTG raja inaktiveerimine mtDNA defektsetes tüvedes ei taasta puudulikku filamenteerumist ja invaseerumist (Aun jt., 2012).

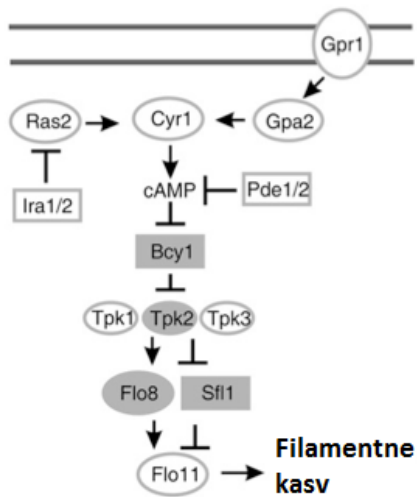


Joonis 3. RTG signaaliülekanerada. Respiratsiooni defekti korral positiivne regulaator Rtg2 fosforüeerib inhibiitorid Mks1 ja Lst8 ning transkriptsiooniaktivaatorid Rtg1-Rtg3 translokeeruvad tuuma ja reguleerivad geeniekspressiooni (Aun jt., 2010 järgi).

RTG raja aktiveerib mitokondri membraanipotentsiaali (MMP) langus (Lai jt. 2002). Varasemalt on kasutatud *ATP1* geeni *ATP1-III* alleeli, mis avaldub F1-ATPase Atp1 subühiku 111. positsioonis fenüülalaniini asemel valiini kodeerimisena ning seeläbi hüperaktiivsusega, mis tõstab MMP-d. On näidatud, et *ATP1-III* mutatsiooni omavad mtDNA defektsed rakud kasvavad YPD vedelsöötmes kiiremini, kui mutatsiooni mitteomavad rakud (Micheli jt., 2012; Francis jt., 2007).

1.3.3 Tsükliline adenosiinmonofosfaadi - proteiinkinaas A rada

Tsükliline adenosiinmonofosfaadi - proteiinkinaas A (cAMP-PKA ingl. k. *cyclic adenosine monophosphate – protein kinase A*) rada muudab valkude importi mitokondrisse ja selle ensüümide sisaldust (Dejean jt., 2002). Gpr1-Gpa2 rakuväline retseptorsüsteem või GTP-seonduv valk Ras2 aktiveerivad adenülaattsüklaasi Cyr1. cAMP molekulide arvu tõus aktiveerib proteiinkinaas A, mille tulemusena dissotseerub inhibiitor Bcy1 ja katalüütiliste subühikute Tpk1/2/3 kompleks. Tpk2 aktiveerib *FLO11* transkriptsiooni läbi Flo8, mis muidu on inhibeeritud Sfl1 poolt (Cullen ja Sprague, 2012; Robertson ja Fink, 1998) (Joonis 4). MtDNA mutantides ei ole cAMP-PKA rada aktiveeritud ja see on üks filamenteerumise defekti põhjuseks (Aun jt. 2012).

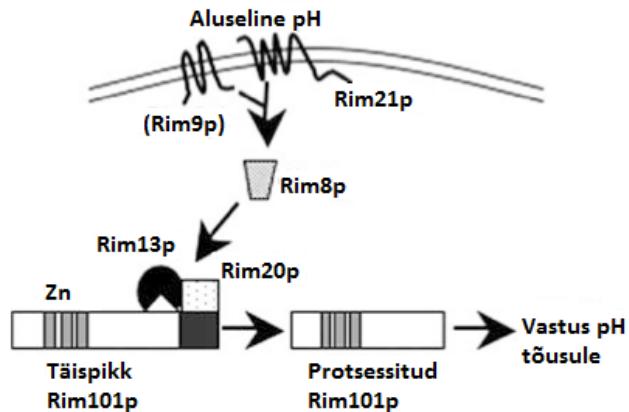


Joonis 4. cAMP-PKA signaaliülekanerada. cAMP molekulide arvu tõus aktiveerib proteiinkinaas A. Bcy1 ja Tpk1/2/3 kompleks dissotseerub ja Tpk2 aktiveerib *FLO11* transkriptsiooni (Aun jt., 2010 järgi).

1.3.4 Rim101 rada

Rim101 rada reguleerib raku vastust väliskeskkonna pH muutumisele. Plasmamembraanis paiknevad sensorid Rim9 ja Rim21 registreerivad aluselise pH, mis käivitab Rim8, Rim13 ja Rim20 kaskaadi. Seejärel lõikab Rim13 täispika Rim101 aktiivseks vormiks (Castrejon jt., 2006; Davis, 2003) (Joonis 5).

Ülegnoomse geeniekspressiooni alanüüsil leiti, et *Arim101* tüvel on 17 geeni aktiveeritud ja 18 geeni represseritud 2 või enam korda rohkem kui metsiktüüpi tüves. Sealhulgas represserib Rim101 geenide *NRG1* ja *SMP1* ekspressiooni, mis omakorda töötavad kui transkriptsiooni repressorid. *Arim101* tüvel on defektne invasiivne kasv ning ta ei sporuleeru, sest Smp1, mis neid protsesse represserib, on aktiveeritud. Ioonide tolerantsus on tunduvalt madalam tänu sellele, et Nrg1 represserib Na⁺ pumpa Ena1. (Lamb ja Mitchell, 2003)



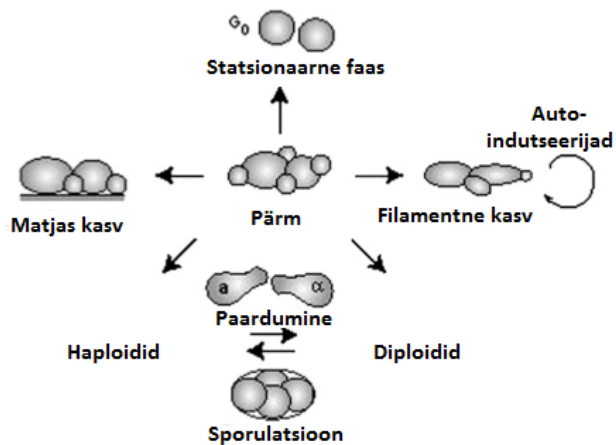
Joonis 5. Rim101 signaaliülekanerada. Sensorid Rim9 ja Rim21 käivitavad Rim8, Rim13 ja Rim20 kaskaadi mille järel täispikk Rim101 lõigatakse proteolüütiliselt aktiivseks vormis ja käivitub vastus pH tõusule. (Davis, 2003 järgi).

1.4 Filamentne kasv

Filamentne kasv on toitainete puudumise poolt reguleeritud kasvuvorm paljudel pärmiliikidel. Patogeensetel pärmiseentel (näiteks *Candida albicans*) põhjustab filamentne kasv rakkude kinnitumist ja kudesse tungimist. Filamentset kasvu reguleerib hulk konserveerunud signaaliülekaneradasid, näiteks: MAPK, cAMP-PKA ja TOR (ingl. k. *target of rapamycin*) (Cullen ja Sprague, 2012).

S. cerevisiae ei moodusta “tõelisi” hüüfe, mis oleks defineeritud kui pikad ja harulised tippudest kasvavad struktuurid. Siiski võivad diploidsed rakud moodustada pseudohüüfe, mis tekivad kui rakud jäävad pungumisel ühendatuks. Pseudohüüf saab tekkida vaid orienteeritud pungumise tagajärjel, unipolaarse mustri järgi pungudes (Gimeno jt., 1992). Pseudohüüfised rakud adapteerivad oma rakutsükli, et sümmeetriliselt jaguneda ning saavutavad aktiini tsütoskeletti modifitseerides pikliku kuju (Kron, 1997). Invaseerumises on kõige olulisem adheeserumine võõraste pindadega. Selleks on vajalikud pinnavalgud Flo11, Flo10 ja Fig2. On näidatud, et *FLO11* ekspressioon on korrelatsioonis invaseerumisega agarisse (Cullen ja Sprague, 2000). Invaseerumist saab esile kutsuda näiteks lämmastiku või glükoosinälgjaga, kuna rakud hakkavad invasiivselt kasvama, et puuduolevatele varudele lähemal olla (Palkova ja Vachova, 2006) (Joonis 6).

Rho⁰ ja *rho⁻* pärmitüved on defektsed filamenteerumises (Aun jt., 2012; Ryan jt., 2012).



Joonis 6. *S. cerevisiae* kasvuvormid. Nii haploidsed ja diploidsed rakud saavad kasvada filamentselt, moodustada biofilmi (libisev kasv) või siseneda statsionaarsesse faasi (G_0) vastusena näljale (glükoosi või lämmastiku nälg). Diploidsed rakud võivad sporuleeruda C ja N nälja korral. Sekreteeritud alkoholid käituvad filamentse kasvu indutseerijatena (Cullen ja Sprague, 2012 järgi).

1.5 *S. cerevisiae* libisev kasv

S. cerevisiae moodustab biofilmi kõvadele pindadele nagu plastik, kuid poolvedelatel (0,3% agar) söötmetel moodustab ta “libiseva kasvu” tulemusena keerulise struktuuriga matja kasvuga kolooniaid (ingl. k. *mat formation*) (Joonis 6, joonis 10A). Matja struktuuriga koloonia moodustumine sõltub substraadist ja toitainete kättesaadavusest. Matja koloonia moodustumine on tugevas sõltuvuses rakupinna adhesiinist Flo11. Nii *FLO11* deleteerimisel kui ka üleekspressioonil on matja kasvu fenotüüp defektne (Reynold and Fink, 2001; Reynolds jt., 2008; Ryan jt., 2012).

Matja koloonia arenedes moodustub kaks iseloomulikku rakupopulatsiooni: koloonia serv (*rim*) ja servast sissepoole jääv ala (hub). Lisaks tekivad koloonia tsentrist väljapoole suunatud kiired (Reynolds ja Fink, 2001). *FLO11* ekspressioon säilib mõlemas rakkude populatsioonis (Reynolds jt., 2008). Erinevus seisneb Flo11 rakusiseses protsessimises. Kasvava matja koloonia serval tekib vedel kiht, et rakud saaksid “voolata” (Karunanithi jt., 2010). *S. cerevisiae* kolooniaid ümbritseb ekstratsellulaarne maatriks (ECM ingl. k. *extracellular matrix*) sarnaselt bakteribiofilmile. Pole teada, kas pärmi kolooniaid ümbritsev ECM omab sarnaselt bakteritele ka kaitsefunktsiooni.

Haploidsete rakkude matja struktuuriga koloonia morfoloogiat mõjutab ka paardumistüüp. *MAT a* paardumistüübiga tüve poolt moodustunud koloonia on natuke väiksema diameetriga ja struktuuris on rohkem kiiri, kui *MAT α* paardumistüübiga tüve koloonias. Diploidsed rakud moodustavad ka matjaid kolooniaid, kuid need on mõõdetelt väiksemad kui haploidsed matjad kolooniad (Reynolds ja Fink, 2001). Haploidne invasiivne kasv ning matja koloonia moodustamine on väga tugevas korrelatsioonis elulemusega (ingl. k. *fitness*, vastavalt $r^2=0.19$ ja $r^2=0.26$; $P \ll 10^{-100}$) (Ryan jt., 2012).

Nagu matja struktuuriga kolooniatel, moodustub ka 2% agari sisaldusega söötmel kasvavatel kolooniatel kaks eristatavat rakkude alampopulatsiooni. Nendel kahel alampopulatsiooni rakkudel on erinev morfoloogia ja kohati ka erinev geeniekspressioon (Cap jt., 2012).

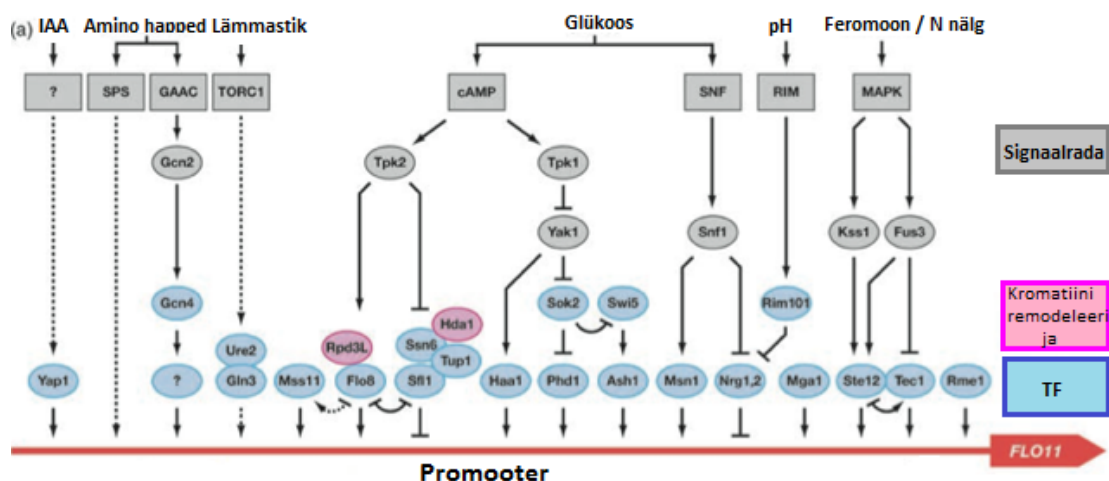
Välimise kihi rakud on natuke suuremad sisaldades palju väikeseid vakuole ja suurt mitokondrit. Lisaks sisaldavad välimise kihi rakud mitmeid suuri lipiidi tilku ja akumulunud glükogeeni. Välimistel rakkudel on üles reguleeritud metaboolsete radade geenid: glükolüüsi ensüümid ja glükoosi fermentatsiooni raja geenid, mis näitab, et tegu on aktiivselt kasvavate rakkudega. PKA rada on aktiivne, sest kõrgelt on ekspresseerunud *STE12* (Cap jt. 2012, Traven jt., 2012).

Sisemise kihi rakud on väiksemad, sisaldavad ühte suurt vakuooli, ühte väikest lipiidi tilku ja palju väikseid mitokondreid. Koloonia sisemises kihis olevates rakkudes on glükolüüs alla reguleeritud, sest neil pole ruumi kuhugi kasvada või on neil toitainete limitatsioon. Üles on reguleeritud glükoneogeneesi aktivaatorid ja transkriptsioonifaktorid, näiteks *NRG1*, mis näitavad glükoosi nälga. Samuti on sisemised rakud lämmastikunäljas, sest üles on reguleeritud geenid, mis on vajalikud aminohapete biosünteesiks ja traspordiks (Traven jt., 2012). Kõrge *SNF1* ekspressioon näitab, et PKA raja aktiivsus on madal (Cap jt., 2012). Kõrge on *RTG1* ekspressioonitase, mis näitab, et RTG rada on aktiivsem kui ülemistes rakkudes (Cap jt., 2012).

1.6 Rakupinna adhesiin Flo11

Flo11 on kõige olulisem rakupinna adhesiin *S. cerevisiae* rakkude kasvaks mõnel muul moel kui üksikuna. Flo11 kuulub suurde glükosüülfosfatidüülinositol-

seotud rakuseina glükoproteiinide perekonda (Verstrepen jt., 2004). Flo11 on 1367 aminohapet (AH) pikk ja nagu teised sama perekonna glükoproteiinid koosneb ta kolmest domeenist. Nendeks on N-terminaalne osa, mis ulatub raku pinnalt välja, pikk keskosa, mis koosneb lühikestest seriin-treoniin kordustest (10-50 AH) ning C-terminaalne osa, mis ühendab valgu rakupinnaga glükofosfatidüülinositol (GPI) ankru abil. *FLO11* promooterala on üle 3kbp pikk ja omab lisaks käesolevas töös analüüsitud signaaliülekanaladele veel mitmeid signaaliülekanalade poolt aktivatsiooni ja repressiooni piirkondi (Joonis 7). Olenevalt tüvest võib Flo11 pikkus varieeruda ja selle tulemusena põhjustada tüvespetsiifilisi fenotüüpe. Näiteks *S. cerevisiae* var. *diastaticus* tüves põhjustab 15 AH-line erinevus Ca^{2+} sõltuvat flokulatsiooni, mitte aga adheerumist pindadele või filamentset kasvu nagu $\Sigma 1278b$ tüves. $\Sigma 1278b$ tüvi aga ei flokuleeru üldse (Guo jt., 2000).



Joonis 7. *FLO11* promooterala regulatsioon erinevate signaaliülekanalade poolt. IAA- indooläädikhape; TF- transkriptsioonifaktor; katkendjoon tähistab epigeneetilisi mõjusid; nooled positiivset regulatsiooni ja riskriipsud inhibitsiooni (Brückner ja Mösch 2011 järgi).

Flo11 võime põhjustada nii erinevaid rakkude käitumismudeleid peitub ilmselt selle N-terminuse posttranslatsioonilises lõikamises umbes 120 aminohappe kauguselt. Flo11 kinnitub rakupinnale GPI ankru abil, mis olenevalt olukorrast lõigatakse lahti tõenäoliselt teiste glükoproteiinide poolt. Kui rakud soovivad matja koloonia moodustumiseks “voolavalt kasvada”, siis lõigatakse Flo11 lahti, kui pindadele kinnituda, siis mitte (Karunanithi jt., 2010).

1.7 *S. cerevisiae* hüper- ja hüpomatja struktuuriga kolooniad

Owen Ryan ja kolleegid avaldasid 2012. aastal ülegenoomse töö, kus analüüsi ~3900 geeni deletsioonimutanti seoses haploidse invasiivse kasvu, pseudohüüfse kasvu ja libiseva kasvu fenotüübiga (Ryan jt., 2012). Leiti vastavalt 577, 700 ja 688 geeni, mis potentsiaalselt mõjutavad neid kasvuvorme. Töös kasutati libiseva kasvu tulemusena tekkivate matjate kolooniate kvantifitseerimiseks pindalade suhet (ingl. k. *biofilm score*), mis on metsiktüüpi matja struktuuriga koloonial võrdsustatud 0-ga. Matja struktuuriga kolooniad skooriga ≥ 26 klassifitseeritakse kui hüpermatja kasvuga ja ≤ -26 kui hüpomatja kasvuga tüved. Ülegenoomne analüüs tuvastas 33 deletsiooni, mis põhjustavad hüpermatjat fenotüüpi ja 655 deletsiooni mis tekitavad hüpomatja fenotüüpi (Ryan jt., 2012).

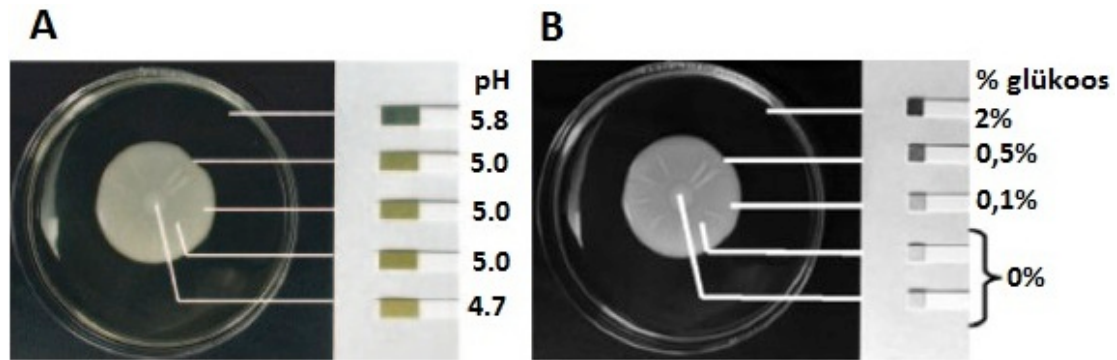
1.8 pH ja glükoosi kontsentratsiooni mõju matja struktuuriga

koloonia moodustumisele

Saccharomyces cerevisiae matja struktuuriga koloonia moodustumine poolvedelal söötmel (0.3% agarisisaldusega söötmel) põhjustab tassil glükoosi ja pH gradiendi tekke ja need gradiendid muudavad matja koloonia struktuuri. Võib arvata, et kõrge pH muudab Flo11 funktsiooni nii, et rakud ei ole enam “voolavad” ja ei levi traditsioonilistesse mõõtudesse (Reynolds jt., 2008).

pH mõju nägemiseks puhverdasid Reynolds ja kolleegid söötme naatrium tsitraat puhvriga väärtustele 4.9, 5.4 ja 5.8 (Reynolds jt., 2008). pH väärtusel 4.9 oli libisev kasv kõige parem. Glükoosi mõju analüüsimiseks kasutati erineva glükoosisaldusega söödet. Selgus, et mida kõrgem on glükoosi sisaldus, seda laiem oli matja koloonia äär.

Matja koloonia kasvamine korreleerub söötmel pH gradiendiga (Joonis 8A). Kui söötme pH oli algselt 5.8, siis matja struktuuriga koloonia keskel, *hub* piirkonnas, on pH väärtus 4.7 ja koloonia ääres, *rim* piirkonnas, on 5.0. Matja koloonia areng ning ääre ja keskpikiirkonna rakkude subpopulatsioonide teke on tugevas sõltuvuses ka söötme glükoosi tasemest. Kõrgetel glükoosi kontsentratsioonidel moodustub ülekaalukalt koloonia äär ja madalatel kontsentratsioonidel keskosa (Joonis 8B). Matja struktuuriga koloonia arenedes väheneb glükoosi kontsentratsioon 0-ni.



Joonis 8. pH ja glükoosi mõju libisevale kasvule. (A) Söötme pH väärtused matja koloonia kasvades. (B) Glükoosi kontsentratsioon matja koloonia arenedes (Reynolds jt., 2008).

Kuna raku tsütoplasma pH väärtus on otseselt seotud rakkude kasvuga, on prootonpumba rolli uuritud pärmi nõrkade hapete stressi korral (Ullah jt., 2012). Pma1 vastutab prootonite rakust välja pumpamise eest ATP arvelt. *PMA1* on eluks hädavajalik geen, seega $\Delta pma1$ tüvi ei ole elujõuline. Siiski on võimalik deleteerida *YGL007*, mis asub *PMA1* promooterregioonis ja selle mutatsiooni tulemusena väheneb *PMA1* ekspressioon 50% ning langeb prootongradient (Ullah jt., 2012).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Pagaripärmi *S. cerevisiae* ülegenoomse deletsioonimutantide analüüsil näidati, et defektse või puuduva mtDNA-ga Σ 1278b mutantidel on poolvedelal söötmel puudulik libisev kasv (Ryan jt., 2012).

Käesoleva töö eesmärgiks oli:

1. detailselt analüüsida *rho*-mutantide matja struktuuriga kolooniate moodustamist
2. kontrollida MAPK, RTG, cAMP-PKA ja Rim101 signaaliülekanalade mõju *rho*-mutantide ja metsiktüüpi rakkude libisevale kasvule
3. analüüsida geneetilisi interaktsioone hüpermatjat kasvu põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel
4. analüüsida mitokondriaalse membraanipotentsiaali muutuse mõju matjale kasvule
5. mõõta *NRG1*, *SMP1*, *CIT2* ja *FLO11* ekspressioonitaset matja struktuuriga koloonia erinevates piirkondades (ääre- ja keskrakkudest)

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud tüved

Töös kasutatud *S. cerevisiae* Σ 1278b tüved on toodud tabelis 1. Töös kasutatud S288C pärmitüved on toodud tabelis 2.

Tabel 1. Töös kasutatud Σ 1278b tüved

Tüve nr	Lühend	Genotüüp	Päritolu
SC Σ 46	<i>WT</i> α	<i>MATa [rho⁺] ura3-52 leu2Δ0</i>	Steffen Rupp
SC Σ 48	<i>WT</i> a	<i>MATa [rho⁺] ura3-52 leu2Δ0</i>	Steffen Rupp
SC Σ 139	Δ <i>mip1</i> a	<i>MATa [rho⁰] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SC Σ 141	Δ <i>mip1</i> α	<i>MATa [rho⁰] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SC Σ 146	Δ <i>rpo41</i>	<i>MATa [rho⁰] ura3-52 leu2Δ0 rpo41::kanMX6</i>	Aun jt., 2012

SCΣ 150	<i>rho</i> ⁰	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 160	<i>rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 245	<i>Δtec1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 tec1::hphMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 248	<i>Δtec1 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 tec1::hphMX6 mip1::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 250	<i>Δtec1 Δrpo41</i>	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 tec1::hphMX6 rpo41::kanMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 272	<i>Δrtg2</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 rtg2::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 276	<i>Δrtg2 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 rtg2::hphMX6 mip1::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 289	<i>Δrtg2 Δrpo41</i>	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 rtg2::hphMX6 rpo41::kanMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 312	<i>Δtpk2</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 tpk2::hphMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 320	<i>Δsfl1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 sfl1::hphMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 326	<i>Δtpk2 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 tpk2::hphMX6 mip1::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 330	<i>Δtpk2 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 tpk2::hphMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 335	<i>Δsfl1 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 sfl1::hphMX6 mip1::natMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 337	<i>Δsfl1 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 sfl1::hphMX6</i>	Aun jt., 2012
SCΣ 503	<i>Δgpa2 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6 gpa2::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 506	<i>Δmsc7 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6 msc7::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 507	<i>Δshr5 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6 shr5::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 509	<i>Δsip4 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6 sip4::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 514	<i>Δste12</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ste12::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 518	<i>Δrim101</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 rim101::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 522	<i>Δygl007</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ygl007::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 524	<i>Δssk2 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6 ssk2::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 525	<i>Δram1 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 mip1::natMX6 ram1::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 527	<i>Δgpa2 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 gpa2::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 529	<i>Δram1 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ram1::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 531	<i>Δmsc7 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 msc7::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 533	<i>Δsip4 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 sip4::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 535	<i>Δssk2 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ssk2::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 537	<i>Δshr5 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 shr5::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 543	<i>Δram1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ram1::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 544	<i>Δmsc7</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 msc7::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 547	<i>Δsip4</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 sip4::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 549	<i>Δssk2</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ssk2::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 551	<i>Δshr5</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 shr5::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ 557	<i>Δste12 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ste12::kanMX6 mip1::natMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 563	<i>Δste12 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ste12::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 567	<i>Δygl007 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ygl007::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 569	<i>Δygl007 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ygl007::kanMX6 mip1::natMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 580	<i>ΔATP1-111 Δmip1</i>	<i>MATa [rho</i> ⁰ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ATP1-111 mip1::natMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ 582	<i>ΔATP1-111 rho</i> ⁻	<i>MATa [rho</i> ⁻ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ATP1-111</i>	Tiina Tamm
SCΣ 593	<i>ΔATP1-111</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 ATP1-111</i>	Tiina Tamm
SCΣ 607	<i>Δgpa2</i>	<i>MATa [rho</i> ⁺ <i>] ura3-52 leu2Δ0 gpa2::kanMX6</i>	Käesolev töö

Tabel 2. Töös kasutatud S288C tüved

Tüve nr	Lühend	Genotüüp	Päritolu
152	<i>Δyer020w</i>	<i>MATa.SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6 gpa2::kanMX6</i>	Euroscarf
3787	<i>Δydl090c</i>	<i>MATa.SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6 ram1::kanMX6</i>	Euroscarf
1002	<i>Δyhr039c</i>	<i>MATa.SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6 msc7::kanMX6</i>	Euroscarf
1334	<i>Δyjl089w</i>	<i>MATa.SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6 sip4::kanMX6</i>	Euroscarf
5406	<i>Δynr031c</i>	<i>MATa.SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6 ssk2::kanMX6</i>	Euroscarf
6260	<i>Δyol110w</i>	<i>MATa.SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6 shr5::kanMX6</i>	Euroscarf

2.2.2 Töös kasutatud söötmed ja kasvutingimused

Pagaripärmi tüvesid kasvatati 30 °C juures YPD söötmes (1% pärmiekstrakt, 2% glükoos, 2% pepton). Tardsöötmete tegemiseks lisati 2% agarit. Transformantide selekteerimiseks kasutati YPD tasse, millesse oli lisatud 100 mg/l nourseotriisiini (Nat) ja/või 300 mg/l genetitsiini (G418). Pärimi libisevat kasvu analüüsiti 0,3% agarisisaldusega YPD söötmel 25 °C juures. Tassid suleti parafilmiga, et takistada nende liigset kuivamist. 85 mm diameetriga tassidel kasutati 20ml söödet ja 135mm tassidel 55 ml söödet.

pH mõju uurimiseks puhverdati YPD sööde pH väärtustele 4.9, 5.4 ja 5.8 kasutades 20mM naatrium tsitraat puhvrit, mille pH oli vastavalt 4.0, 4.5 ja 5.0 (Reynolds jt., 2008).

2.2.3 Pagaripärmi libiseva kasvu analüüs.

Pagaripärmi üksikkoloonia külvati puust tiku abil 0,3% agarisisaldusega YPD tassi keskele (Reynolds ja Fink, 2001). Iga tüvi külvati 10 paralleelina ning katset sooritati 2 korduses.

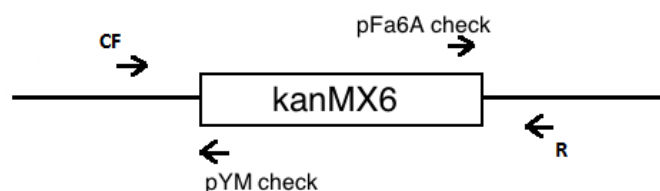
Ajapunktides 5. ning 12. päeva mõõdeti matjate kolooniate diameetrid ja 12. päeval loendati rakud ning moodustunud matjad struktuurid fotograferiti Canon EOS 350d kaameraga. Fotode töötlemiseks kasutati programmi iPhoto (Apple Inc). Matja struktuuriga koloonia arengu uurimiseks metsiktüüpi tüvedes 36 päeva jooksul mõõdeti kolooniate diameetrid ning loendati rakud ajapunktides 1., 2., 3., 5., 7., 9., 12., 24. ja 36. päev. Matja koloonia arengu uurimiseks *rho*-mutantsetes tüvedes 36 päeva jooksul mõõdeti kolooniate diameetrid ning loendati rakud ajapunktides 5., 12., 24. ja 36. päev. Kolooniate pindalade suhe arvutati kasutades programmi CellProfiler 2.0 (Lamprecht jt., 2007). Algoritm kvantifitseerib uuritavate kolooniate erinevuse

metsiktüüpi kolooniast ning matja struktuuriga koloonia moodustamise efektiivsus arvutatakse valemi $((\text{Mutant}/\text{WT})-1)*100\%$ järgi, arvestades metsiktüüpi tüve (WT) väärtuseks 0. Joonistel on pindalade suhe tähistatud lühendiga PS. Iga tüve pindala arvutamiseks kasutati vähemalt 3 kolooniat.

Rakkude arvu kindlaks tegemiseks eemaldati rakud tassilt pipetiga ja suspendeeriti 20ml H₂O's. Peale tugevat vortex'it sonikeeriti 1 ml rakkude lahust 1min 25% võimsusega. Rakkude arv loeti Neubaueri kambrit kasutades.

2.2.4 Deletsioonitüvede konstrueerimine

Deletsioonikassettide amplifitseerimiseks kasutati BY4741 baasil konstrueeritud deletsioonimutante (EUROSCARF kollektsioon), millest huvipakkuvad geenid olid deleteeritud *kanMX6* kassetiga. BY4741 deletsioonimutantidest (Tabel 2) eraldati totaalne DNA pärmi LioAc-SDS meetodi abil (Lööke jt., 2011). Eraldatud DNA-lt amplifitseeriti huvipakkuv *kanMX6* kassett PCR abil PFU polümeraasiga, huvipakkuvast ORF-ist üles- ja allavoolu jäävaid praimereid kasutades. Vastavate praimerite järjestused on toodud lisas 1. Deletsioonikassett transformeeriti tüvedesse SCΣ48 (*WT* a), SCΣ139 (*Δmip1* a), SCΣ160 (*rho*⁻) liitium-atsetaat meetodil (Knop jt., 1999). Seejärel plaaditi transformatsioonisegu G418 antibiootikumi sisaldavale YPD selektsioonisöötmele, *Δmip1* tüved Nat ja G418 sisaldavale selektsioonisöötmele. Töös valmistatud deletsioonitüvedest eraldati totaalne DNA LioAc-SDS meetodi abil (Lööke jt., 2011). Deletsioonikasseti korrektset integreerumist kontrolliti PCR abil kasutades *kanMX6* kassetispetsiifilisi praimereid pYM check või pFa6A check ning geenispetsiifilisi praimereid CF või R (Joonis 9). Praimerite järjetsused on toodud lisas 1.



Joonis 9. Deletsioonikassettide integratsiooni kontroll PCR meetodi abil. Geeni deletsiooni kindlakstegemiseks kasutati praimeripaare, millest üks seondub integratsioonikassetile ning teine sellest üles- või allavoolu jäävale alale geenist. CF- *control forward*; R- *reverse*; pFa6A check – kassetisisene *forward* praimer; pYM check – kassetisisene *reverse* praimer.

2.2.5 Totaalse RNA eraldamine ja qRT-PCR

Totaalne RNA eraldati *S. cerevisiae* matja struktuuriga kolooniate *rim* ja *hub* piirkonna rakkudest. *Rim* fraktsiooni tarvis kasutati metsiktüüpi tüve puhul 2 matja kasvuga kolooniat ja *rho*-mutantide puhul 3 matja kasvu kolooniat. *Hub*'i rakkude saamiseks kasutati metsiktüüpi tüve puhul 1 matja kasvu kolooniat ja *rho* -mutantide puhul 2 matja kasvu kolooniat. Rakud külmutati vedelas N₂ ja säilitati -80°C.

Kontrolliks kasutati vedelsöötmes logaritmilises kasvufaasis kasvavaid rakke. Üksikkoloonia külvati 20 ml YPD vedelsöötmesse ja kasvatati tiheduseni OD₆₀₀ = 0,8-0,9. Rakud tsentrifugeeriti 3200 rpm 4°C (Hettich UNIVERSAL 32R). Kasutati 14-16 OD₆₀₀ ühikut rakke. Rakud külmutati vedelas N₂ ja säilitati -80°C.

RNA eraldamiseks pesti rakud 1ml jääkülma RNA puhvriga (50mM Tris (HCl) pH 7.4; 100mM NaCl; 10mM EDTA). Seejärel lisati 100 µl jääkülma RNA puhvrit, ½ ruumala ulatuses klaasteri, segati vortexil 4°C juures 3 min, lisati 450 µl 1,3% SDS-i sisaldavat RNA puhvrit ning 450 µl fenooli (pH 5.0) ja segati vortexil 4°C juures 3 min. Seejärel tsentrifugeeriti segu 10min 13000 rpm lauatsentrifugeerimise temperatuuril 4°C ning ekstraheeriti vesifaas fenool/kloroform seguga puhtuse tagamiseks 2 korda. Fenooltöödeldud RNA-le lisati 1ml 100% EtOH, 20 µl 4M NaCl ja sadestati -80°C juures üleöö. RNA sadestamiseks tsentrifugeeriti segu 10 min temperatuuril 4°C 13000rpm, sade pesti 70% EtOH-ga, kuivatati ja lahustati 50 µl vees ning säilitati -80°C juures. RNA kontsentratsioon määrati Thermo NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer masinal. 5 µg RNA-le tehti 4U DNase I (Thermo) töötlus koos 32U Ribolock (Thermo) ensüümiga 10X DNase puhverlahuses 37°C juures 30minutit. Proovid puhastati fenool/kloroform ekstraheerimise teel (Sambrook jt.1989).

cDNA sünteesiti 1,5 µg RNA-lt *reverse* praimerite (20 pmol praimeriga kohta) segu kasutades 15U RevertAid (Thermo) pöördtranskriptaasiga reaktsioonimahus 8 µl 42°C 60 minutit ja reaktsioon lõpetati 70°C 10 minutit. qRT-PCR analüüsiks lahjendati segu 80 korda. Kasutatud praimerite järjestused on toodud lisa 2.

Geeniekspressiooni mõõtmine toimus mahus 10 µl mis sisaldas cDNA-d, qPCR Master Mix-i (Thermo) ja sobivat praimeritepaari (lõppkontsentratsioon 1pmol/µl) (Lisa 2). Reaktsioonisegu, H₂O- ja DNase töötluste kontrollid (ilma cDNA sünteesita) pipeteeriti 384 kaevuga plaatile kolmes korduses. PCR reaktsioon viidi

läbi ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System instrumendil. Reaktsiooni protokoll oli denaturatsioon 95°C 15 min, seejärel 40 tsüklit 95 °C 15 sek ja 60 °C 1 minut. Iga praimeripaariga viidi reaktsioon läbi samalt matriitsahelalt kolmes korduses ning arvutati keskmine tulemus.

Tulemusi analüüsiti MS Excel programmiga võrdleval C_T meetodil (Schmittgen ja Licak, 2008) ning normaliseeriti geenide *UBC6* ja *TAF10* ekspressioonitaseme vastu.

Katset korrati vähemalt 2 korduses.

2.3 Tulemused

2.3.1 Pagaripärmi *rho*-mutantide ja metsiktüüpi tüvede matja kasvu analüüs

S. cerevisiae matja kasvu fenomen kirjeldati esmakordselt 2001. aastal teadlaste Reynolds ja Fink poolt (Reynolds ja Fink, 2001). Sama grupp analüüsis ka paardumistüübist tulenevaid fenotüübi erinevusi metsiktüüpi pärmitüvel. Hiljuti näidati *S. cerevisiae* ülegenoomses deletsioonimutantide analüüsis, et defektne mitokondriaalne DNA mõjutab rakkudel matja struktuuriga kolooniate kasvu ning moodustuvad väiksemad matjad struktuurid kui metsiktüüpi tüve puhul (Ryan jt., 2012).

Pagaripärmi *rho*-mutantide matja kasvu detailsemaks analüüsiks kasutati WT (α), WT (a), $\Delta mip1$ (a) ja $\Delta mip1$ (α) tüvesid paardumistüübi (*MATa*, *MAT α*) mõju uurimiseks libisevale kasvule. Deletsioon $\Delta mip1$ tüves oli tehtud *natMX6* kassetiga. *Arpo41* tüvel on deletsiooniks kasutatud *natMX6* kasseti asemel *hphMX6* kassetti, et välistada deletsioonikasseti mõju matja kasvu fenotüübile. Etiidiumbromiidi meetodil eraldatud *rho*-mutandid (*rho*⁰ ja *rho*⁻) sisaldavad metsiktüüpi tuumagenoomi

Metsiktüüpi tüvede matja struktuuriga kolooniatel on selgesti eristuvad struktuurielemendid. Nendeks on koloonia äär (ingl. k. *rim*), koloonia keskmised rakud (ingl. k. *hub*) ja kiired, mis on suunatud tsentrist väljapoole (Joonis 10A). 12 päeva kasvanud WT (α), WT (a) tüvede võrdluses matja koloonia diameetris (58 +/-5 mm) olulist erinevust ei ole (Joonis 10B). Rakkude arv matjas koloonias on WT (a) tüvel $3,7 \times 10^9$ ning WT (α) tüvel $2,7 \times 10^9$ rakku (Joonis 10B). Metsiktüüpi tüvedel on olenevalt paardumistüübist erinevus kiirte arvus ja intensiivsuses, aga neid parameetreid ei ole võimalik kvantifitseerida epigeneetikast põhjustatud tüvesiseste suurte varieeruvuste tõttu (Joonis 10A).

WT (α) ja WT (a) tüvede võrdluses peaks paardumistüübiga *MATa* tüve moodustatud matjas koloonia olema väiksem kui *MAT α* koloonia ning moodustama rohkem kiiri (Reynolds ja Fink, 2001). Käesoleva töö tulemused seda ei näita. Põhjused võivad olla tüvesiseses varieeruvuses.

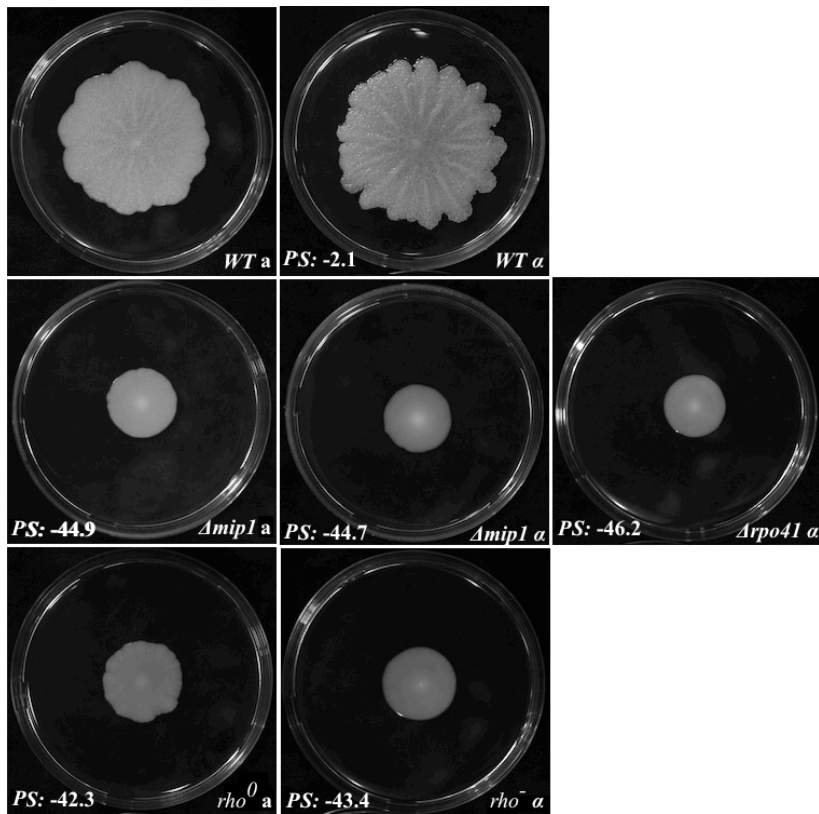
WT ja *rho*-mutantide matja struktuuriga kolooniate võrdluses erineb kolooniate morfoloogia väga oluliselt. *Rho*-mutantide puhul ei ole eristatavaid struktuurielemente nagu metsiktüübil (äär, keskoht, kiired). Ainuke ülejäänud

struktuurist eristuv piirkond on matja koloonia keskkoh, kus on rakud paksema kihina (Joonis 10A). 12. päeval erinevad *rho*-mutantide moodustatud koloonia parameetrid võrreldes metsiktüübiga oluliselt. Matja koloonia diameeter on *rho*-mutantidel 23 \pm 2mm, mis on \sim 2.5 korda väiksem metsiktüüpi tüve poolt moodustatud kolooniast. Kolooniat moodustavate rakkude arv on *rho*-mutantidel 7x10⁸ rakku ehk rakkude arvu poolest \sim 4.2 korda vähem, kui metsiktüübi koloonias. Pindalade suhe (PS) on *rho*-mutantidel keskmiselt -44 \pm 3.

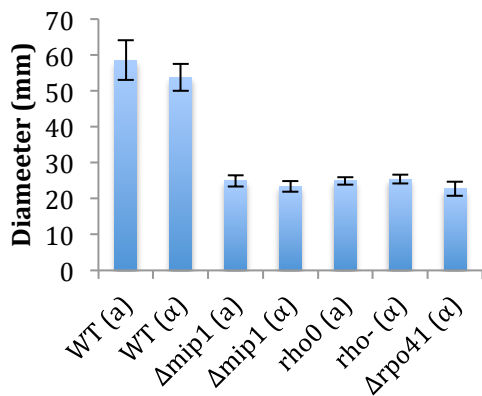
5 päeva kasvanud nii metsiktüüpi kui *rho*-mutantide matjatel kolooniatel (Lisa 3) on diameetri ja pindala suhted ning matja kasvu kolooniate morfoloogia väga sarnased võrreldes 12 päeva kasvanud kolooniatega. Pindalade suhted (PS: -44) kattuvad ülegenoomse töö tulemustega (Ryan jt., 2012).

Rho-mutantide matja kasvuga kolooniate fenotüüpi paardumistüüp ei mõjuta, $\Delta mip1$ a ja $\Delta mip1a$ ei oma erinevusi koloonia morfoloogias. Samuti ei mõjuta libisevat kasvu deletsioonikasseti valik, mis oli $\Delta mip1$ tüvede puhul *natMX6* ning $\Delta rpo41$ tüvel *hphMX6*. Erinevust ei tekita ka mutandi konstrueerimise viis. EtBr-ga tehtud tüved on parameetritelt peaaegu identsed homoloogilise rekombinatsiooniga tehtud mutantidega (Joonis 10).

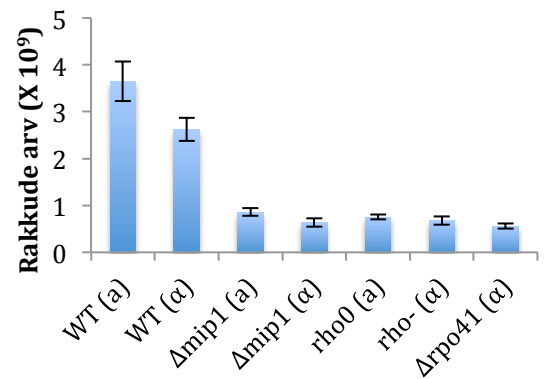
A



B



C



Joonis 10. Tüvede WT (α) (SC Σ -46), WT (a) (SC Σ -48), $\Delta mip1$ (a) (SC Σ -139), $\Delta mip1$ (α) (SC Σ -141), $\Delta rpo41$ (SC Σ -146), rho^0 (SC Σ -150), rho^- (SC Σ -160) matja struktuuriga kolooniate analüüs (A) 12 päeva kasvanud matja kasvuga kolooniad. Pindalade suhe on tähistatud lühendiga PS. (B) 12 päeva kasvanud kolooniate diameetrid (mm). (C) Rakkude arv 12 päeva kasvanud matja struktuuriga kolooniates.

2.3.2 Metsiktüüpi ja *rho*-mutantide matja struktuuriga kolooniate kasv ajas

S. cerevisiae kasvatamisel rikkas vedelsöötmes on selgelt eristuvad kasvufaasid. Peale söötmesse inokuleerimist on *lag*-faas, kus rakud kohanevad uute tingimustega, seejärel on *log*-faas ehk eksponentsiaalne kasvufaas kus rakud punguvad umbes 90 minuti järel ja statsionaarne faas, kus kultuur on saavutanud maksimaalse tiheduse ja söötmes olevad toitained on ära tarbitud.

Antud katse eesmärk on analüüsida metsiktüüpi tüve WT (a) (SC Σ -48), *Δ mip1* (α) (SC Σ -141) ja *Δ rpo41* (α) (SC Σ -146) matja kasvuga koloonia arengut 36 päeva lõikes *rho*-mutantide aeglasema kasvukiiruse tõttu. Uuriti, kas kasv neis tüvedes on lineaarne või mingis ajapunktis aktiivsem/vähemaktiivsem ning kas rakkude arv on seotud diameetriga. Metsiktüüpi tüve puhul kasutati 9 ajapunkti, *rho*-mutantide puhul kasutati 4 ajapunkti nende aeglasema kasvukiiruse tõttu.

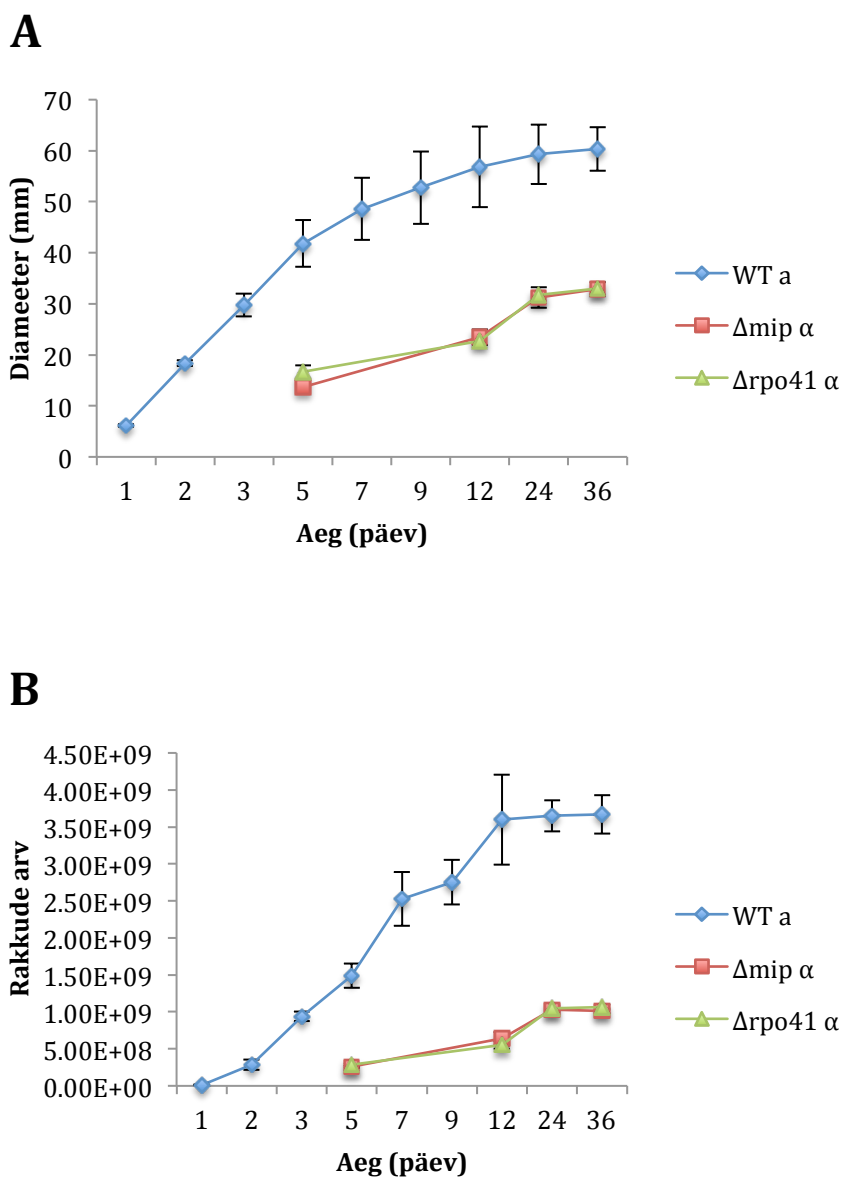
Metsiktüüpi tüvel on kasv kõige intensiivsem 3-6 päeval (Joonis 11). 9-12 päeva vahemikus kasv aeglustub ning alates 12. päevast jõuab platoole. Et siduda rakkude arv diameetriga, arvutati matjate kolooniate pindala ja tehti korrelatsioonianalüüs pindalade ja rakkude arvu vahel metsiktüüpi koloonias kuni 12. päevani. Korrelatsioonikordaja (diameeter,rakkude arv) $r = 0.989$, mis tähendab, et nende tunnuste vahel on väga tugev seos.

*Rho*⁰ ja *rho*⁻ tüvede omavahelisel võrdlusel ei tekkinud erinevust matja kasvuga kolooniate struktuuris ja mõõtmetes ka pikema aja jooksul kui 12 päeva. Koloonia kasvamine praktiliselt seiskub mõlemal tüvel peale 24 päeva (Joonis 11). Neis tüvedes ei toimu metsiktüüpi kolooniale iseloomulikku hüpet diameetri suurenemises 3-6 päeval.

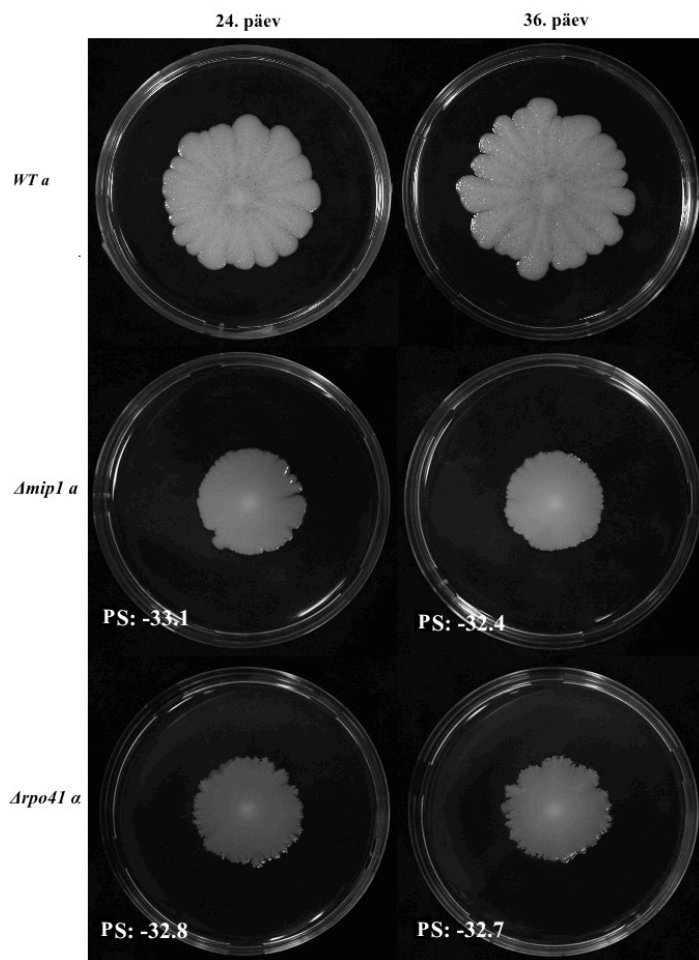
12 päeva kasvanud *rho*-mutantide poolt moodustatud kolooniad sarnanesid 2,5 päeva vanuse metsiktüüpi kolooniaga diameetri (~23 mm) ja rakkude arvu (8×10^8 rakku) poolest. 36 päeva kasvanud *rho* koloonia on sarnane 3-4 päeva kasvanud metsiktüüpi kolooniaga (Joonis 11). Metsiktüüpi ja *rho*-mutantide matja struktuuriga kolooniate pindalade suhe on alates 24. päevast ligikaudu -33 (Joonis 12).

36 päevane katse sooritati ka 135mm diameetriga Petri tassidel, kus söötmekogus oli 55 ml. Nii metsiktüüpi kui ka *rho* tüvede kolooniate kasv seiskus

peale 36. päeva. Pindalade suhe metsiktüüpi ja *rho*-mutantide matja struktuuriga koloonia ja vahel on -43,6. (Andmed ei ole näidatud).



Joonis 11. WT (a) (SC Σ -48), *Amip1* (α) (SC Σ -141) ja *Arpo41* (SC Σ -146) matja struktuuriga koloonia areng 36 päeva jooksul. (A) Koloonia diameetrid (mm) erinevates ajapunktides. (B) Kolooniast moodustavate rakkude arv erinevates ajapunktides.



Joonis 12. WT (a) (SCΣ-48), *Δmip1* (a) (SCΣ-139), *Δrpo41* (SCΣ-146) tüvede matja struktuuriga kolooniad 24. ja 36. päeval. PS tähistab pindalade suhet.

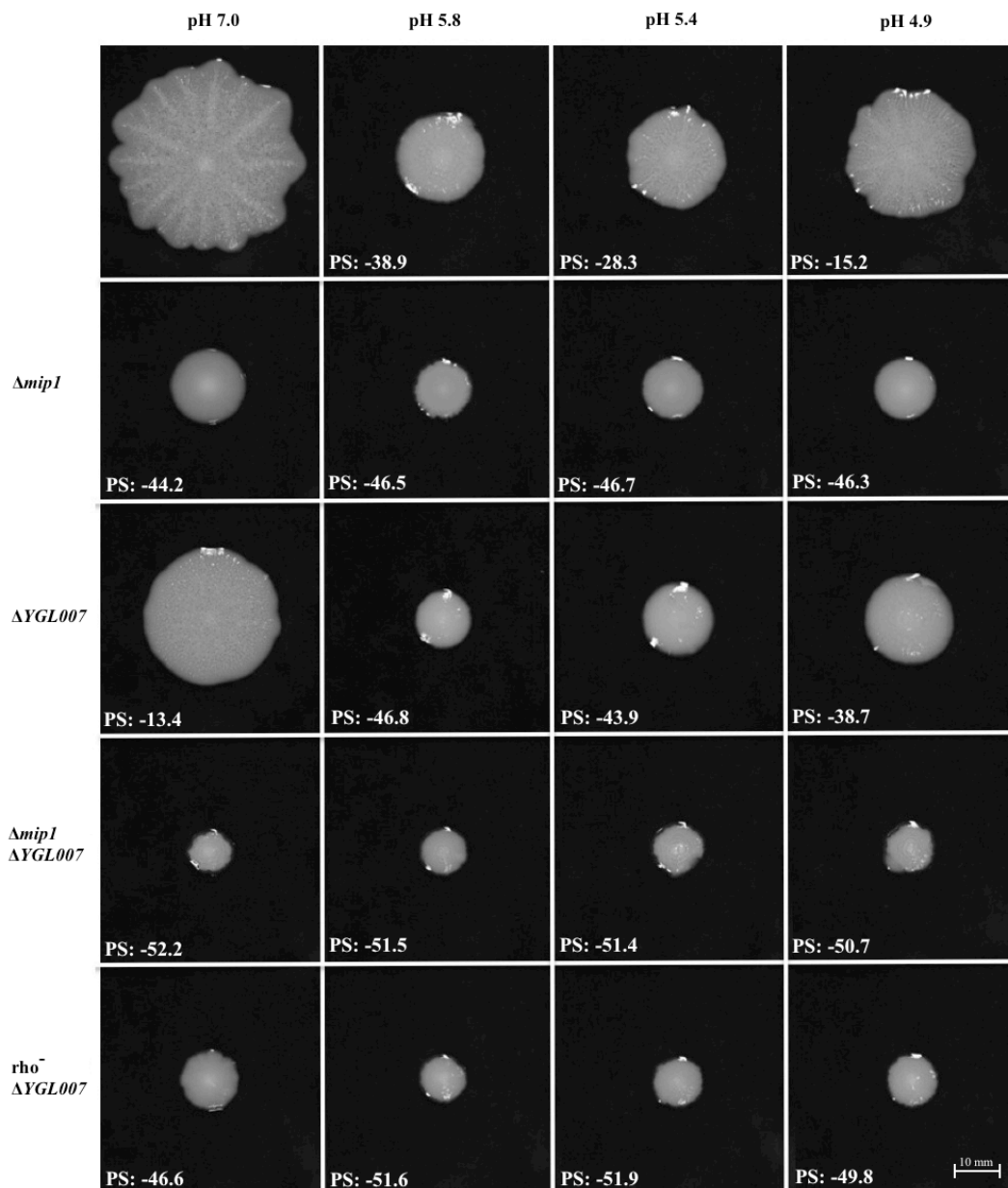
2.3.3 pH mõju matja struktuuriga koloonia kasvule

S. cerevisiae vajab libisevaks kasvuks poolvedelal söötmel pH ja glükoosi gradienti (Reynolds jt., 2008). Võimalik, et pH muudab Flo11 funktsiooni. Arvatakse, et aluseliste pH väärtuste juures ei lõigata Flo11 raku pinnalt lahti ja rakud ei saa libiseda (Reynolds jt. 2008).

SöötmepH mõju analüüsimiseks puhverdati naatrium tsitraatpuhvriga söötme pH, mis algselt oli 7.0, väärtustele 4.9, 5.4 ja 5.8. Tulemustest selgub, et söötme pH puhverdamine tsütoplasma pH väärtustega sarnaseks ei paranda libisevat kasvu *rho*-mutantidel ega metsiktüüpi tüvel. Puhverdatud söötmega tassidest on libisev kasv kõige parem tassidel, mille pH väärtus on 4.9, aga jääb oluliselt alla puhverdamata tassil (pH 7.0) moodustunud koloonia mõõtmetele (Joonis 13). Tulemused kinnitavad, et tassil moodustuv pH gradient on libisevaks kasvuks väga oluline.

Pma1 on rakule eluks vajalik prootonpump prootonite rakust välja pumpamiseks. Deleteerides *PMAI* promooteralas paikneva lugemisraami *YGL007*, väheneb *PMAI* ekspressioon umbes 50%. Tänu defektsele prootonpumbale muutub tsütoplasma pH sööme pH-ga sarnasemaks (Ullah jt., 2012).

YGL007 deleteerimine metsiktüüpi tüvest mõjutab libisevat kasvu negatiivselt võrreldes metsiktüüpi tüvega. Samuti mõjub *YGL007* deletsioon negatiivselt *rho*-mutantide libisevale kasvule (Joonis 13).



Joonis 13. pH mõju pagaripärmi libisevale kasvule. 5 päeva kasvanud metsiktüüpi ja *rho*-mutantide matja struktuuriga kolooniate fenotüübid. PS, pindalade suhe.

2.3.4 Defektsete signaaliülekanerajade mõju pagari pärmi libisevale kasvule

On teada, et mitmed konserveerunud signaaliülekanerajad on olulised *S. cerevisiae* mitmerakuliste struktuuride tekkeks. Antud katse eesmärk oli tuvastada inaktiveeritud RTG, FG MAPK ja cAMP-PKA radade mõju matja struktuuriga kolooniate kasvule metsiktüüpi, ρ^0 kui ka ρ^- tüvedes. Pindalade suhte arvutamiseks kasutati 5 päeva kasvanud kolooniad, et tulemusi oleks võimalik kõrvutada Ryan jt., 2012 tööga.

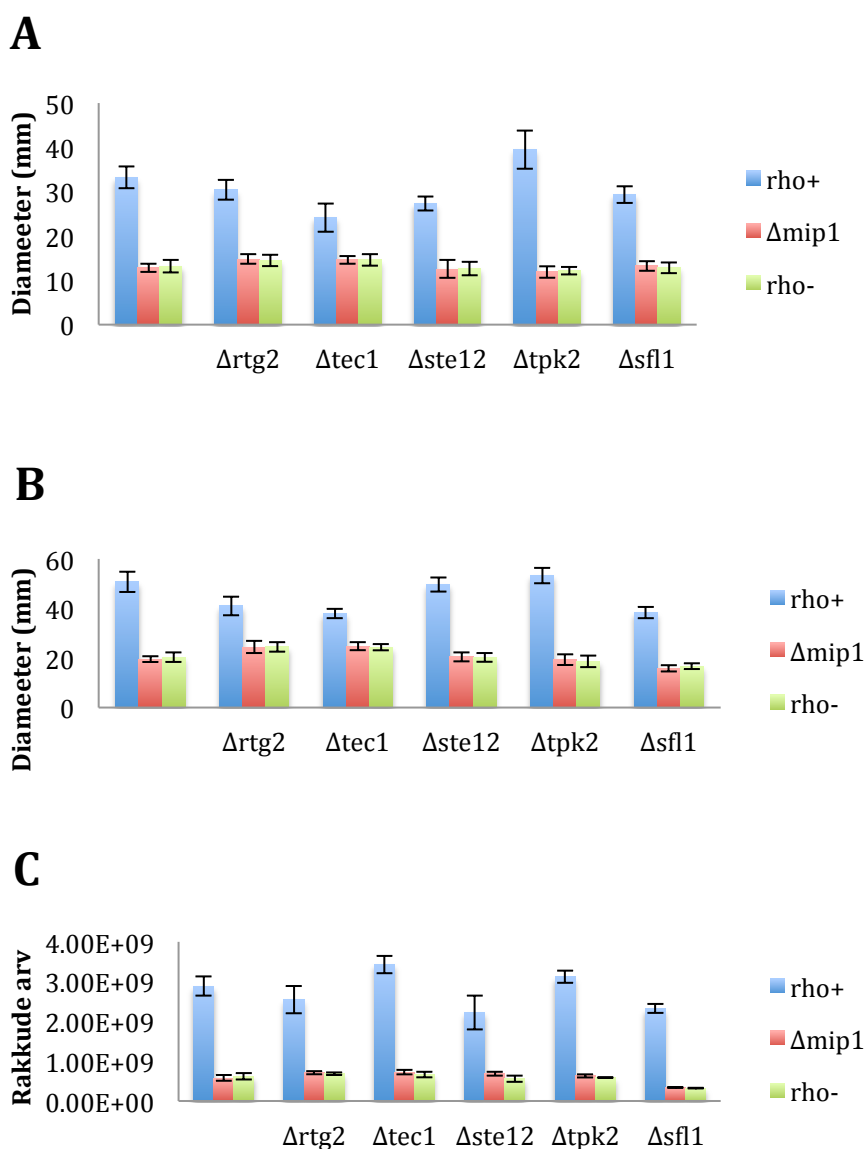
Rtg2 on RTG raja positiivne regulaator. *RTG2* deletsioon metsiktüüpi tüves matja koloonia parameetreid ei mõjuta: PS, diameeter ja rakkude arv võrreldes metsiktüübiga praktiliselt ei muutu (Joonis 14). *Artg2* moodustab vähem kiiri (Joonis 15).

Tec1 on MAPK raja poolt aktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis on oluline pseudohüüfseks kasvuks. $\Delta tec1$ tüve matja kasvuga koloonia on väiksem kui metsiktüübil (PS: -9.4). Üllatuslikult on $\Delta tec1$ tüve matja koloonia rakkude arv suurem kui metsiktüübil. $\Delta tec1$ koloonia on metsiktüüpi kolooniast paksem ja korrapärasem/siledam (metsiktüüpi koloonia on kohati väga õhuke, isegi auklik). Ülegenoomses töös näidatud pindalade suhe: -27.3, mis klassifitseerub kui hüpomatt, ei kattu käesoleva tööga. MAPK raja transkriptsioonifaktori Ste12 deletsioon põhjustab samuti erinevuse metsiktüüpi tüve matjast kolooniast. Mõõdmetelt on $\Delta ste12$ koloonia väiksem (PS: -7.3). $\Delta ste12$ tüve matja struktuuriga koloonia on väga sarnane metsiktüüpi kolooniale kiirte mustri poolest (Joonis 14 ja 15).

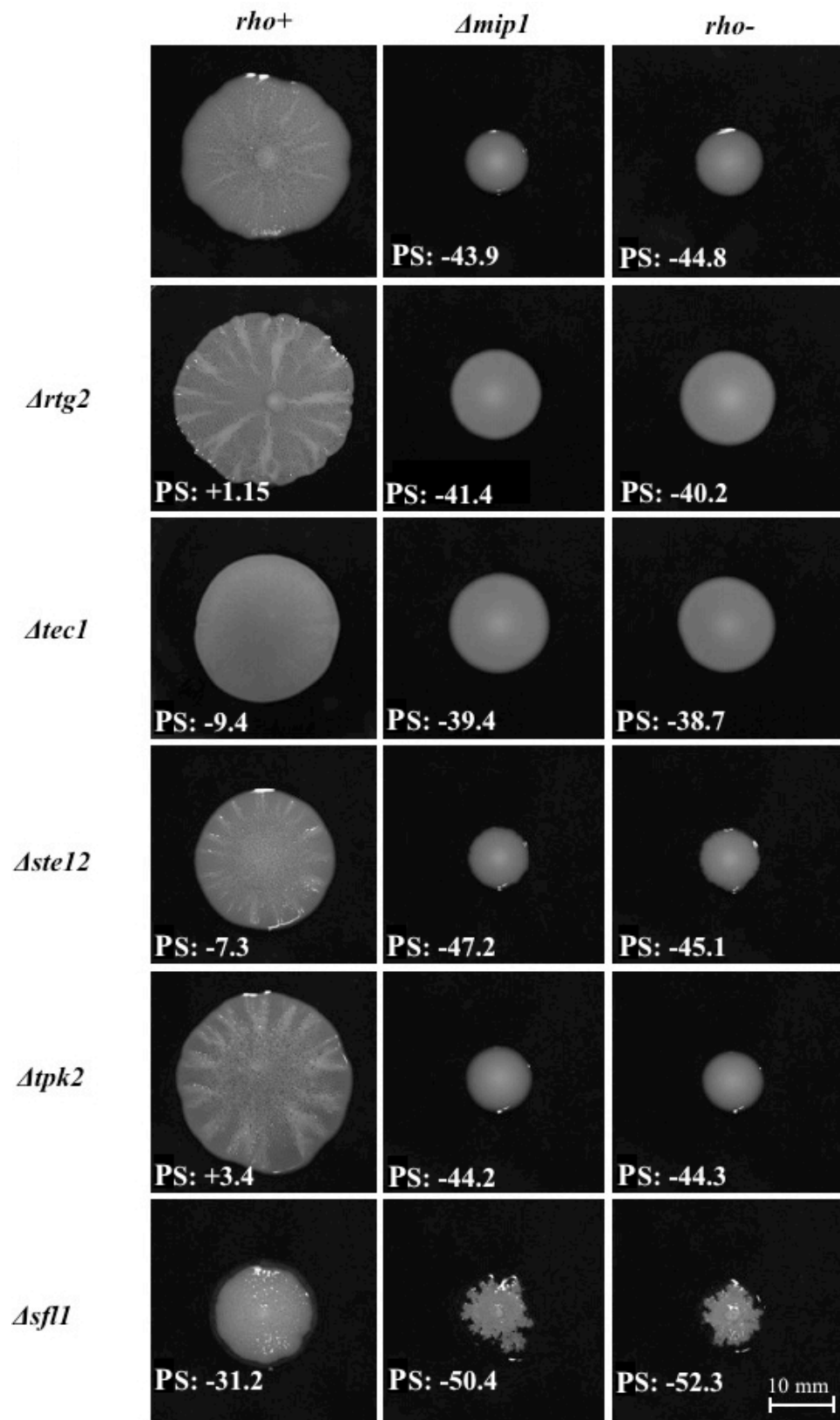
cAMP-PKA raja komponent Tpk2 aktiveerib *FLO11* transkriptsiooni läbi transkriptsioonifaktori Flo8. Tpk2 deleteerimine ei põhjusta erinevusi matja koloonia struktuuris, välja arvata koloonia muster. $\Delta tpk2$ tüve koloonial on kiiri vähem ning nad on jämedamad. Lisaks algvad kiired keskkohast kaugemalt kui metsiktüüpi koloonias (Joonis 15). cAMP-PKA raja *FLO11* repressori Sfl1 deletsioon põhjustab matja kasvuga koloonia morfoloogias olulise erinevuse metsiktüüpi kolooniast. Koloonia on kõrgem ja kiirte struktuur puudub. Samuti on koloonia natuke paksem (Joonis 14 ja 15). Erinevus tuleb ilmselt *FLO11* üleekspressioonist $\Delta sfl1$ tüves (Cullen ja Sprague, 2012).

Eespool mainitud geenide deleteerimisel ρ tüvedest toimusid muutused libiseva kasvu fenotüübis neis ρ -tüvedes, millest deleteeriti *SFL1* või *TEC1*.

Ülejäänud 3 geeni deletsioon libiseva kasvu fenotüübile mõju ei avaldanud (Joonis 14 ja 15). $\Delta sf11$ kaksikmutantide koloonia on kõrgem ning serv on sakiline võrreldes Δmip või rho^- tüvega. $\Delta sf11$ kaksikmutantide kolooniade pindalade suhe on -51 ± 0.7 võrreldes $\Delta mip1$ või rho^- tüvega (PS: -44.4 ± 0.5). Ka $\Delta sf11$ kaksikmutantide kolooniade rakkude arv on väiksem kui rho^- tüvedel (6.8×10^8 vs 3.3×10^8 , Joonis 14C). $\Delta tec1$ kaksikmutantide rakud moodustavad pindala poolest suuremaid matjaid kolooniaid, kui rho^- tüved (PS: -39 ± 0.5 $\Delta tec1$ vs -44.4 ± 0.5 rho^- tüved) (Joonis 14 ja 15).



Joonis 14. Inaktiveeritud RTG, FG MAPK ja cAMP-PKA radade mõju matja struktuuriga koloonia kasvule. **(A)** 5 päeva kasvanud tüvede kolooniade diameetrid (mm). **(B)** 12 päeva kasvanud tüvede kolooniade diameetrid (mm). **(C)** Rakkude arv 12 päeva kasvanud kolooniates.



Joonis 15. Inaktiveeritud RTG, FG MAPK ja cAMP-PKA radade mõju matja kasvuga kolooniate fenotüübile 5 päeva peale inokuleerimist. PS tähistab pindalade suhet.

2.3.5 Geneetilised interaktsioonid hüpermatjat kasvu põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel

Ülegenoomses töös, kus analüüsiti invaseerumist, pseudohüüfset kasvu ja matja struktuuriga koloonia kasvu kirjeldati hüper- ja hüpomatjaid kolooniaid. Matjad kolooniad kvantifitseeriti metsiktüüpi tüvest pindalade suhtega, kriteeriumite järgi $PS \geq 26 =$ hüpermatjas ning $PS \leq -26 =$ hüpomatjas koloonia (Ryan jt., 2012). Leiti 33 hüpermati moodustumist põhjustavat geenideletsiooni, neist geenidest valiti käesolevasse töösse analüüsiks 6, mis on seotud signaaliülekanedega (Tabel 3). Katsete eesmärk oli uurida, kas hüpermati fenotüüpi põhjustav mutatsioon taastab/parandab *rho*-mutantide defektset matja kasvu fenotüüpi.

Tabel 3. Katsesse valitud hüpermatja struktuuriga koloonia kasvu põhjustavad geenid

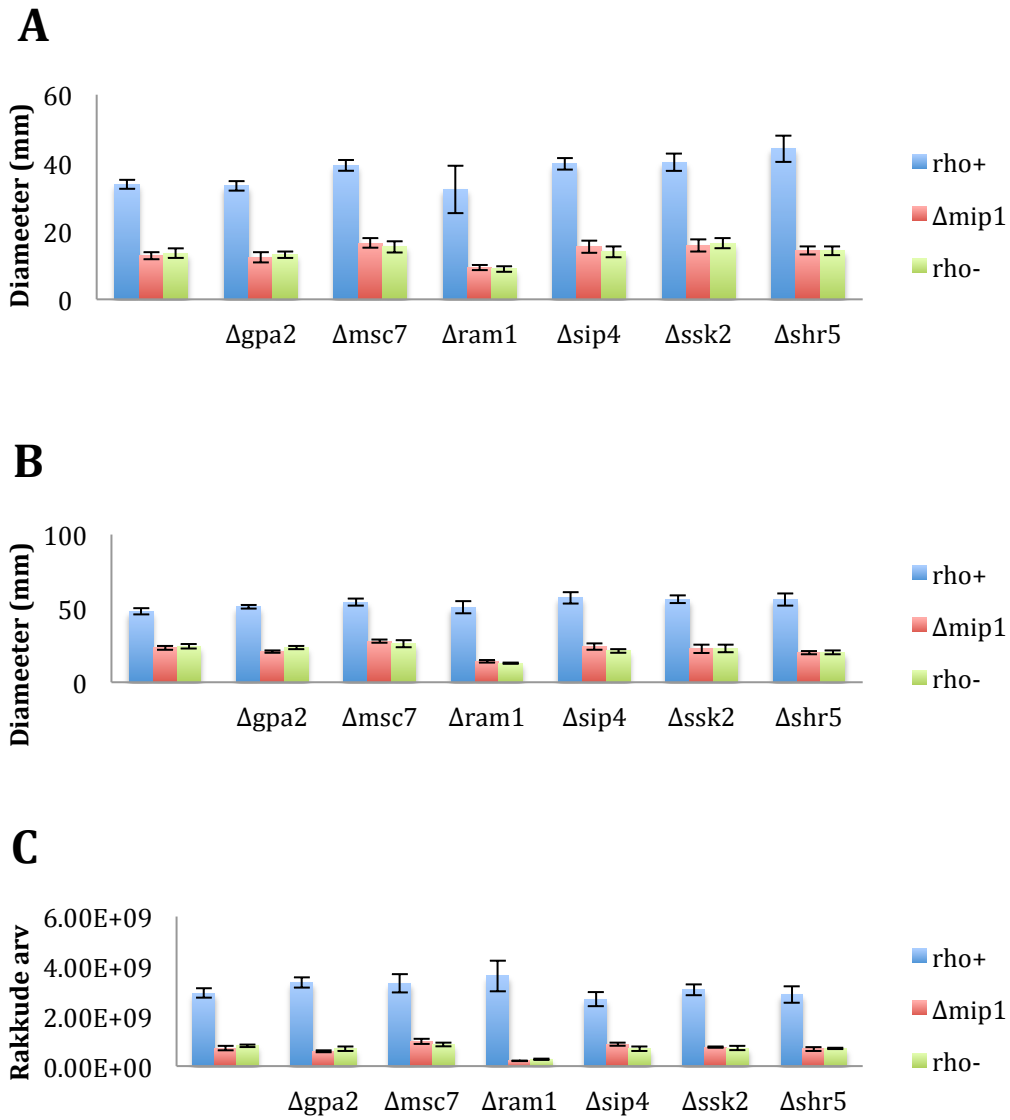
Geen	Funktsioon	Viide
<i>GPA2</i>	Glükoosi äratundmine cAMP-PKA signaaliülekande rajas.	(Colombo jt., 1998)
<i>MSC7</i>	Tundmatu funktsiooniga valk, kuid $\Delta msc7$ tüvel on raku hingamine madal või puudub.	(Thompson ja Stahl, 1999)
<i>RAM1</i>	Mõjub fernesüültrasferaasi aktiivsusele, mis modifitseerib vastavalt Ras valke ja a-faktorit, et need lokaliseeruks rakumembraani.	(He jt., 1991)
<i>SIP4</i>	Transkriptsiooni aktivaator, mis indutseerib glükoneogeneesi. Teda reguleerib Snf1 proteiinkinaas.	(Lesage jt., 1996)
<i>SSK2</i>	Rakuvälise osmootse rõhu tõusu korral aktiveeruv Hog1 MAPK (mitogen activated protein kinase) raja komponent. Rõhu tõusuga Ssk2 autofosforuleerub Ssk1 mõjul.	(Posas ja Saito, 1998)
<i>SHR5</i>	Palmitüültrasferaasi subühik. Lisab palmitüülhappe jäägi Ras valkudele, et need saaksid korrektselt membraanis lokaliseeruda.	(Jung jt., 1995)

Eelmainitud geenide avatud lugemisraamid vahetati BY4741 deletsioonitüvede kollektsoonist pärit *kanMX6* kasseti vastu metsiktüüpi (SC Σ -48), $\Delta mip1$ (SC Σ -139) ja ρ^- (SC Σ -160) tüvedes ning analüüsiti saadud mutantide matjat kasvu.

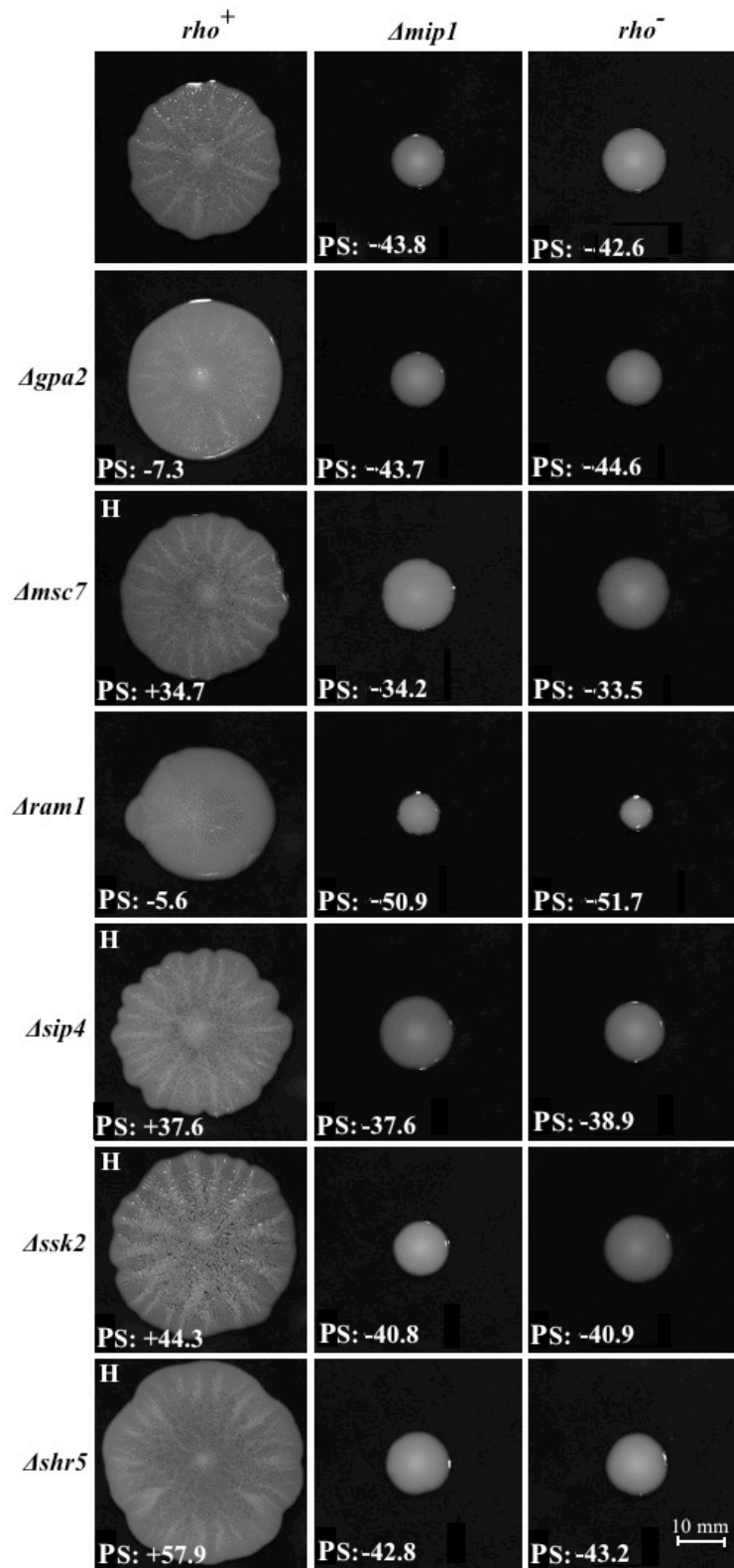
Ryan jt. 2012 kriteeriumite järgi ($((\text{Mutant}/\text{WT})-1)*100\%$) moodustasid hüpermatte $\Delta msc7$ (PS: 34.8), $\Delta sip4$ (PS: +37.6) $\Delta ssk2$ (PS: +44.3) ja $\Delta shr5$ (PS: +57.9) tüved. Hüpermatjad kolooniad on tähistatud joonisel 17 "H"-tähega. $\Delta gpa2$ ja $\Delta ram1$

hüpermatti ei moodustanud. *Δgpa2* tüvi moodustas struktuuritu koloonia, mis sarnanes suuresti *Δtec1* matja kolooniaga (Joonis 16, joonis 17). *Δgpa2* matja koloonia rakkude arv oli sarnaselt *Δtec1*-le samuti suurem kui metsiktüübil. Hüpermatti see tüvi ei moodustanud (PS: -7.3). Lorenz jt., 2010 kirjeldab *Δgpa2* tüve samasugusena kui metsiktüüpi, mis hüpermatti ei moodusta. *Δram1* matja struktuuriga koloonia sarnanes metsiktüübile ja hüpermatti ei moodustanud (PS: -5.6). Ei saa välistada *kanMX6* kasseti täiendavat ebaspetsiifilist integreerumist genoomi, aga 6 sõltumatut isolaati andsid identse struktuuritu ja parameetritelt metsiktüübiga sarnase matja koloonia (Joonis 16 ja 17).

Mitte ükski deletsioon, mis metsiktüüpi tüves põhjustas hüpermatti teket ei taastanud *rho⁻* ega *rho⁰* tüves matja struktuuriga koloonia kasvu (Joonis 16 ja 17). Oluliselt väiksema koloonia teistest uuritutest moodustas *Δram1* deletsiooniga *rho⁰* ja *rho⁻* tüvi nii pindalade suhte, diameetri kui ka rakkude arvu järgi nii 5. kui 12. päeval (Joonis 16, joonis 17).



Joonis 16. Hüpermatja koloonia moodustumist põhjustavad mutatsioonid ρ^+ , ρ^- ja ρ^0 tüvedes. **(A)** 5 päeva kasvanud tüvede kolooniate diameetrid (mm). **(B)** 12 päeva kasvanud tüvede kolooniate diameetrid (mm). **(C)** Rakkude arv 12 päeva kasvanud kolooniates.



Joonis 17. Metsiktüüpi tüves hüpermatjat kolooniat põhjustavad deletsioonid *rho*⁺, *rho*⁻ ja *rho*⁰ tüvedes 5 päeva peale inokuleerimist. PS tähistab pindalade suhet, “H” tähega on märgitud hüpermatjat kolooniad.

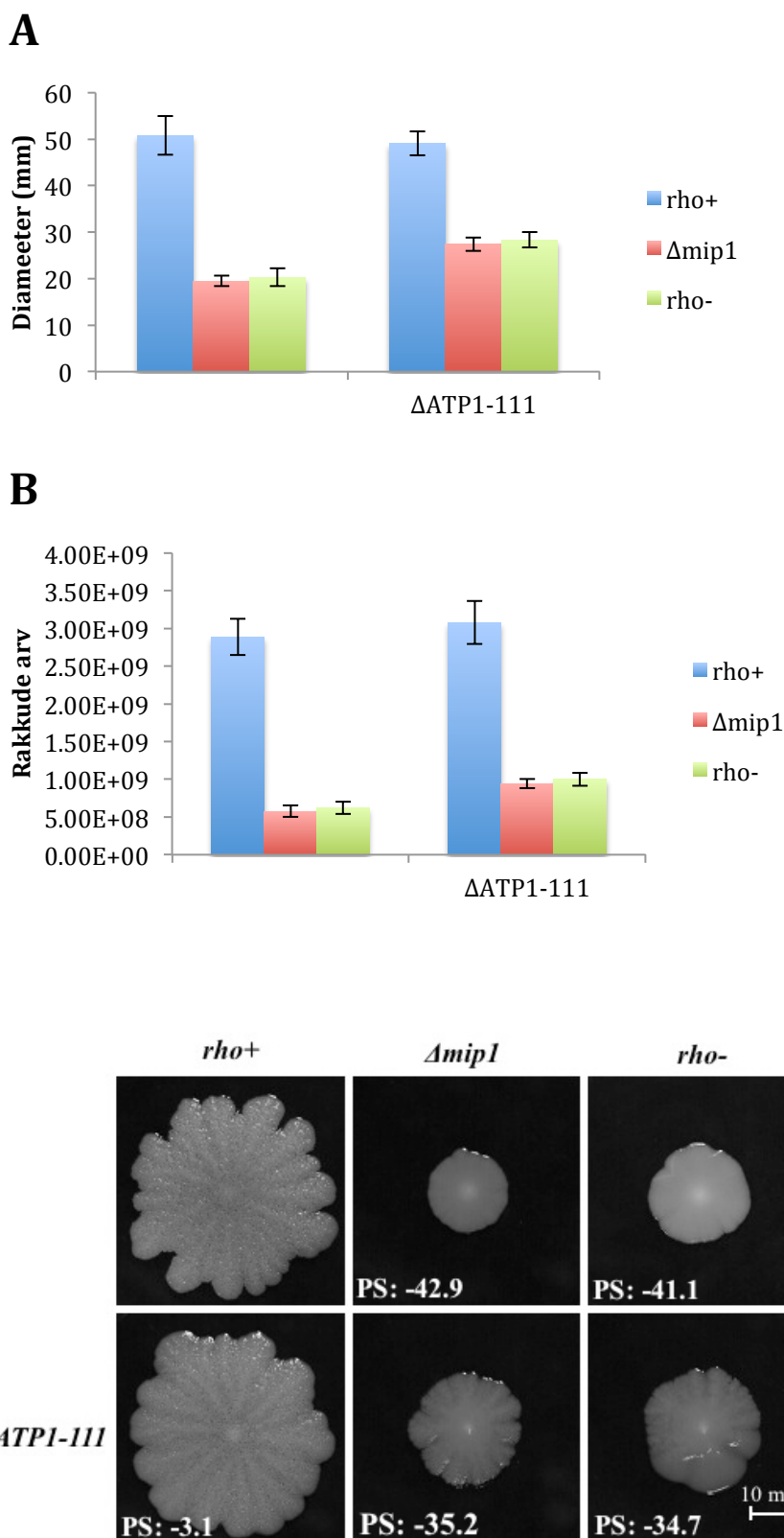
2.3.6 Mitokondriaalse membraanipotentsiaali mõju *rho*-mutantide matja struktuuriga koloonia kasvule

RTG raja aktiveerib mitokondri membraanipotentsiaali (MMP) langus (Micheli jt., 2012). Varasemalt on kasutatud *ATP1-III* punktmutatsiooni *ATP1* geenis, mis valgujärjestusse kodeerib fenüülalaniini asemel valiini. See avaldub F1-ATPase Atp1 subühiku hüperaktiivsusena ja tõstab MMP-d (Micheli jt., 2012).

Antud katse eesmärk oli selgitada välja, kas *ATP1* geeni tehtud mutatsioon *ATP1-III*, mis tõstab mitokondri membraanipotentsiaali, mõjutab *rho*⁰ ja *rho*⁻ tüvedes matja struktuuriga kolooniate kasvu.

Nii 5. kui ka 12. päeval ei põhjustanud *ATP1-III* mutatsioon *rho*⁺ tüves olulist erinevust koloonia diameetris, pindalade suhtes ega rakkude arvus (Lisa 4, joonis 18). 5 päeva kasvanud *rho*⁰ ja *rho*⁻ tüvede matja kasvuga koloonites põhjustas *ATP1-III* mutatsioon olulise erinevuse koloonia diameetris. Nende mutantide diameeter oli 16,5 mm +/- 1mm kui *rho*-mutantide diameetrid olid 13 mm +/-1mm. *ATP1-III* mutatsiooniga *rho*-mutantide kolooniad olid rohkem sakilised võrreldes *rho*-mutantidega, sarnandes metsiktüüpi tüve matjatele kolooniatele (Lisa 4).

ATP1-III mutatsiooniga *rho*-mutantide ja *rho*-mutantide 12. päeva matja kasvuga kolooniatel on märgata mõõtmetes oluline erinevus. *ATP1-III* mutatsiooniga *rho* tüvedel on diameeter ~8mm suurem (Joonis 18A) ning rakkude arv peaaegu 2 korda suurem (Joonis 18B). Pindalade suhe *ATP1-III* mutatsiooniga *rho* tüvedel oli ligikaudu -35 ning *rho*-mutantide -41,5. Koloonia struktuuris 5. päeval esinenud tähelepanek on võimendunud, *ATP1-III* mutatsiooniga *rho* mutantidel hakkavad tekkima metsiktüübile iseloomulikud kiired.



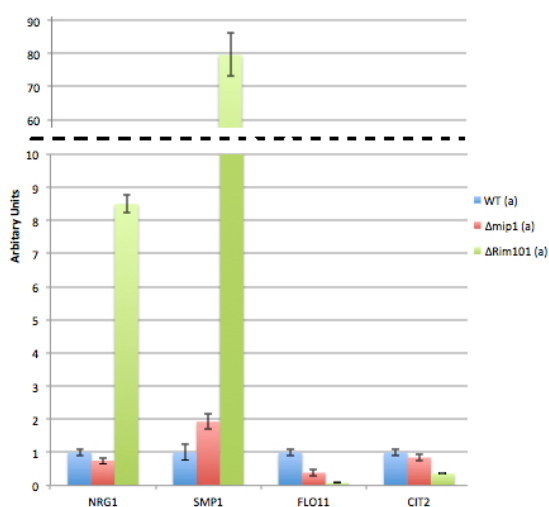
Joonis 18. *ATP1-111* mutatsiooni mõju rho^+ , rho^- ja rho^0 tüvede libisevale kasvule. (A) 12. päeva matja kasvu koloonia diameeter (mm). (B) Rakkude arv 12. päeva kasvanud koloonias. (C) 12 päeva kasvanud matja struktuuriga kolooniate morfoloogia.

2.3.7 *FLO11*, *CIT2*, *NRG1* ja *SMP1* ekspressioon matja struktuuriga koloonia ääres ning keskel

Eelnevalt on näidatud, et geeniekspressioon pärmikoloonia erinevates piirkondades on erinev (Traven jt., 2012; Cap jt., 2012). 2% agarisisaldusega YPD tassidel moodustuvates kolooniates jagunevad rakud kahte alampopulatsiooni: välimised ja sisemised. Matjal koloonial on samuti selgelt eristuvad rakkude populatsioonid: äär (*rim*) ja keskpiirkond (*hub*)

Selleks, et uurida kas matja kasvuga koloonia erinevates piirkondades olevatel rakkudel on geeniekspressioon erinevalt reguleeritud viidi läbi qRT-PCR analüüs. Antud katse eesmärk oli valida sihtmärkgeenid Rim101 raja aktiivsuse detekteerimiseks ning mõõta Rim101 (*NRG1*, *SMP1*) raja, RTG raja (*CIT2*) ja *FLO11* ekspressiooni matja kasvu koloonia eristuvates piirkondades, äärest ja keskpiirkonnast.

Ekspponentsiaalses kasvufaasis olevate metsiktüüpi rakkude ekspressioonitasemed on normaliseeritud üheks. Lamb ja Mitchell, 2002. aastal näitasid, et Rim101 reguleerib negatiivselt *NRG1* ja *SMP1*-le. Logaritmilises kasvufaasis vedelkultuuris olevas $\Delta rim101$ tüves on *SMP1* ekspressioon tõusnud 79,54 korda ja *NRG1* ekspressioon 8,50 korda võrreldes metsiktüüpi tüvega. *CIT2* ekspressioon $\Delta rim101$ tüves on vähenenud 3 korda ja *FLO11* ekspressioon 12 korda (Joonis 19).



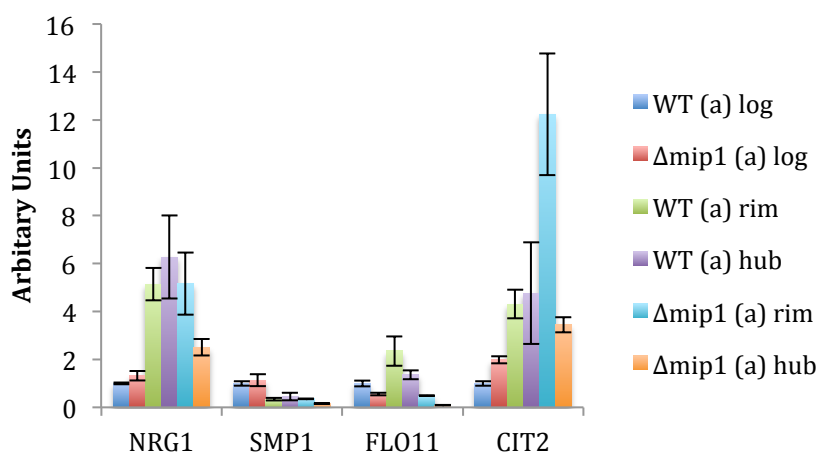
Joonis 19. *FLO11*, *CIT2*, *NRG1* ja *SMP1* ekspressioon logaritmilises kasvufaasis olevates metsiktüüpi, $\Delta mip1$ ja $\Delta rim101$ rakkudes.

Amip1 vedelkultuuris on *NRG1* 1,3 korda, *SMP1* 1,13 korda ja *CIT2* ekspressioon peaaegu 2 korda tõusnud. *FLO11* ekspressioon on langenud peaaegu 2 korda, võrreldes logaritmilises kasvufaasis oleva metsiktüüpi tüvega (Joonis 20).

FLO11 ekspressioon metsiktüüpi matja koloonia ääres on võrreldes logaritmilises kasvufaasis olevate rakkudega tõusnud 2,35 korda ning koloonia keskel tõusnud 1,36 korda. *FLO11* ekspressioon jäi *Amip1* koloonia ääres samaks, aga langes koloonia keskel umbes 6.5 korda võrreldes *Amip1* logaritmilise kasvufaasi rakkudega. Metsiktüüpi rakkude poolt moodustatud matjate kolooniate ääres on *FLO11* kõrgem, mis viitab aktiivsele libisevale kasvule.

CIT2 ekspressioon on metsiktüüpi matjas koloonias nii ääres kui keskel tõusnud umbes 4,5 korda võrreldes log-faasi rakkudega. See tähendab, et nii ääre kui ka keskipiirkonna rakkudel on aktiveerunud RTG signaaliülekanal. *Amip1* tüve ääres tõusis *CIT2* ekspressioon 6,5 korda ja keskel 1,72 korda võrreldes log-faasis olevate *Amip1* tüve rakkudega.

NRG1 ekspressioon WT koloonias tõusis umbes 5,5 korda, *Amip1* koloonia ääres 5,155 korda ja *Amip1* koloonia keskel 2,5 korda. *SMP1* ekspressioon on nii metsiktüüpi kui *Amip1* koloonia mõlemates piirkondades langenud vähemalt 3 korda. Selgub, et *NRG1* ja *SMP1* ekspresseeruvad matjates kolooniates vastupidiselt.



Joonis 20. Geeniekspressioon matja kasvu kolooniate ääres (*rim*) ja keskel (*hub*) metsiktüüpi ja *rho*-mutantide rakkudes.

2.4 Arutelu

Saccharomyces cerevisiae libiseva kasvu fenotüüpi kirjeldati esmakordselt poolvedelal söötmel 2001. aastal Todd Reynolds'i ja Gerald Fink'i poolt (Reynolds ja Fink, 2001). Käesolevas töös uuriti libisevat kasvu mtDNA defektsetes tüvedes, kuna ei olnud teada, kas *rho*-mutantidel esineb libisev kasv. Käesoleva töö tulemused näitavad, et *rho*-mutantidel esineb defektne libisev kasv. Seda kinnitati hiljem ka 2012. aastal ilmunud ülegenoomses töös (Ryan jt., 2012).

Üks käesoleva töö eesmärgi oli analüüsida metsiktüüpi tüve ning *rho*⁰ ja *rho*⁻ tüvede matja struktuuriga koloonia kasvu 36 päeva lõikes. 36 päevane ajavahemik valiti seetõttu, et välistada *rho*-mutantide aeglasest kasvust tulenevat defektset libisevat kasvu. Uuriti, kas nende tüvede kolooniate kasv on lineaarne või mingis ajapunktis aktiivsem/vähemaktiivsem.

Tulemused näitasid, et 3-6 päeval oli metsiktüüpi tüvel koloonia kasv kõige aktiivsem, 9-12 päeva vahemikus kasv aeglustus ning alates 12. päevast praktiliselt seiskus. Selleks ajaks oli Petri tass ¾ osas kolooniat täis kasvanud ning ilmselt matja koloonia kasvamiseks vajalik pH ja glükoosi gradient puudusid (Reynolds jt., 2008). *Rho*-mutandi poolt moodustunud koloonia jõuab rakkude arvu ja diameetri poolest 24. päevaks 3-4 päeva kasvanud metsiktüüpi koloonia tasemele. Peale seda kasv praktiliselt seiskub, sest koloonia diameeter suureneb järgneva 12 päeva jooksul ainult ~1,5 mm (Joonis 10A). Tehtud katsete tulemused lubavad öelda, et *rho*-mutantide matja kasvuga koloonia ei kasva kunagi nii suureks kui metsiktüübil.

Matja kasvuga koloonias jagunevad rakud kahte selgelt eristatavasse alampopulatsiooni, koloonia ääres paiknevad rakud (*rim*) ja koloonia keskel olevad rakud (*hub*) (Reynolds ja Fink, 2001). *Rho*-mutantide matja kasvuga koloonial on veel selgesti eristuv rakkude piirkond, mida varasemad uurijad pole siiani maininud - koloonia keskpunkt (külvamise koht). See piirkond on ülejäänud matjast kolooniast tunduvalt paksem (Joonis 11A). Tõenäoliselt tekib see struktuur tänu madalale *FLO11* tasemele ja kuna rakkudel pole võimalik libisevalt kasvada, siis rakukihtide arv tõuseb.

On näidatud, et 2% agarisisaldusega YPD söötmel kasvanud koloonia sisemise kihi rakkudes on *NRG1* (Na⁺ pumba Ena1 negatiivne regulaator) kõrgemalt

ekspresseeritud kui koloonia välimistes rakkudes ja rakkude vastus aluselisele pH-le on nõrgem (Lamb ja Mitchell, 2002). Kõrgemalt kui välimistes rakkudes on ekspresseeritud ka *RTG1*, mis viitab RTG raja aktivatsioonile (Cap jt., 2012; Traven jt., 2012). Matja kasvuga kolooniate puhul on *NRG1* ja RTG raja aktiivsus reguleeritud teisiti. Metsiktüüpi matja kasvuga koloonias on äärepiirkonna rakkudel *NRG1* tase 5,15 korda kõrgem ja keskele jäävatel rakkudel 6,27 korda kõrgem kui logaritmilises kasvufaasis olevates rakkudes. Kui arvestada veapiire, siis *NRG1* ekspressioon matja kasvuga koloonia ääres ja keskel oluliselt ei erine. *Rho*-mutantide matja struktuuriga kolooniates on äärepiirkonna rakkude *NRG1* tase 5,15 korda kõrgem võrreldes logaritmilises kasvufaasis olevate rakkudega, aga keskel ainult 2,5 korda kõrgem (Joonis 20).

Käesoleva töö raames uuriti pH mõju libisevale kasvule Reynolds jt., 2008 metoodikat kasutades. On teada, et libisev kasv vajab pH gradienti ja adhesioon agariga läbi Flo11 on pH-st sõltuv. Arvati, et *rho* mutandid ei suuda energiadefitsiidi tõttu pH gradienti tekitada. Katses puhverdati naatrium tsitraatpuhvriga sööde pH väärtustele 4.9, 5.4 ja 5.8. Nii metsiktüüpi rakkude matja struktuuriga koloonia kui ka *rho*-mutantide koloonia näitas parimat kasvu puhverdatud söötmetest pH väärtusel 4.9, mis on tsütoplasmale lähedane pH väärtus. Siiski olid parimad tulemused puhverdamata YPD söötmel, mille pH väärtus oli 7.0. Kuna tsütoplasma pH väärtus on otseselt seotud koloonia kasvuga, tehti sellega paremaks manipuleerimiseks nii metsiktüüpi tüvele kui ka *rho* mutandile mutatsioon geeni *PMA1* promooterregiooni (lugemisraami *YGL007*). *Pma1* on prootonpump, mis ATP energia arvel pumpab prootoneid rakust välja. Deletsioon lugemisraamis *YGL007* vähendab *PMA1* ekspressioon umbes 50% ning raku võime prootongradienti hoida nõrgeneb (Ullah jt., 2012). Antud mutatsioon *rho*-mutantide matjat kasvu ei taastanud ning mõjus negatiivselt ka metsiktüüpi matja kasvuga kolooniatele.

RTG rada aktiveerub mittefunktsioneeriva mitokondri puhul ja nälja korral nii rho^+ kui mtDNA defektsetes *S. cerevisiae* rakkudes (Lui ja Butow, 2006; Aun jt. 2012). On näidatud, et positiivsete regulaatorite *RTG1* ja *RTG2* deletsioon inhibeerib filamentset kasvu rho^+ tüvedes (Chavel jt., 2010). RTG raja mahareguleerimine *rho*-mutantides ei taasta pseudohüüfset kasvu (Aun jt. 2012).

Käesoleva töö tulemused toetavad eelnevate uurijate tulemusi, mis näitavad, et RTG rada on aktiveeritud *rho*-mutantides ning nälja korral metsiktüüpi tüves RTG rada aktiveerub. Tulemustest on näha, et nii *rim* kui *hub* piirkonnas on *CIT2* (RTG raja sihtmärk) kõrgemalt ekspresseeritud. RTG raja positiivse sihtmärgi *CIT2* ekspressioon on mõlemas piirkonnas ~4.5 korda kõrgem kui logaritmilise kasvufaasi rakkudel. *Rho*-tüves on *rim* piirkonnas *CIT2* ekspressioon 12,2 korda kõrgem ning *hub* piirkonnas ainult 3,45 korda kõrgem logaritmilises kasvufaasis olevatest metsiktüüpi rakkudest. (Joonis 20).

Antud töö tulemuste põhjal saab öelda, et RTG raja täielik inaktivatsioon matjat kasvu *rho*-mutantides ei paranda (Joonis 15). Pindalade suhe on *Artg2* mutatsiooniga *rho* mutantides sarnane -42 ± 2 *rho* tüvedega, samuti ei erine teised mõõdetud parameetrid nagu diameeter ja rakkude arv. RTG raja inaktivatsioon ei muuda matja koloonia fenotüüpi ka metsiktüüpi tüves. *Artg2* tüve matja koloonia kasv on parameetritelt väga sarnane metsiktüüpi tüvega, seega ei sõltu libisev kasv selle raja inaktivatsioonist.

RTG raja aktiveerib mitokondri membraanipotentsiaali (MMP) langus. *ATP1-111* punktmutatsioon *ATP1* geenis avaldub F1-ATPase Atp1 subühiku hüperaktiivsuse ja tõstab MMP-d (Micheli jt., 2012). Käesoleva töö tulemustest on näha MMP tõusu positiivset efekti *rho*-mutantide matja koloonia moodustumisele nii rakkude arvus, diameetris kui ka osaliselt tekkima hakkavas metsiktüübile omases matja koloonia struktuuris (Joonis 18). Täielikult matja kasvuga koloonia fenotüüp siiski ei taastu, kuna arvatavasti ei ole MMP langus *rho*-mutantide defekti ainus põhjus.

On teada, et *S. cerevisiae* libisev kasv on tugevas sõltuvuses rakupinna adhesiini *FLO11* ekspresioonitasemest (Reynolds ja Fink, 2001). $\Delta flo11$ tüvi moodustab *rho*-mutantidega võrreldes pindala poolest sarnaseid hüpomatte (Ryan jt., 2012). *Rho*-mutantides on *FLO11* ekspressioon 3 korda madalam kui metsiktüüpi tüves (Aun jt. 2012). Käesoleva töö tulemused kinnitavad seda fakti, *FLO11* ekspressioon logaritmilises kasvufaasis olevates *rho*-mutantides on ~2 korda madalam kui logaritmilises kasvufaasis olevates metsiktüübi rakkudes. Matja kasvuga koloonias vahekord *rho*-mutantide ja metsiktüüpi rakkude vahel ei säili. Metsiktüüpi tüve *rim* piirkonnas on *FLO11* ekspressioon 2.3 korda kõrgem ning *hub* piirkonnas

1.36 korda kõrgem, kui logaritmilises faasis olevatel rakkudel. Sellest järeldeb, et libisemiseks on *FLO11* kõrgem ekspressioon väga oluline. *Rho*-mutandi matja kasvuga koloonias on võrreldes *WT* logaritmilise kasvufaasiga *FLO11* ekspressioonitase *rim* piirkonnas 2.5 korda madalam, ning *hub* piirkonnas 12,8 korda madalam (Joonis 20). Nendest tulemustest võiks järeldada, et *FLO11* madal ekspressioonitase tekitab defektse mati. Kui deleteerida *rho*-mutantides transkriptsioonifaktor *SFL1*, mis on *FLO11* repressor, halveneb libisev kasv veelgi (Joonis 15). $\Delta sf11$ tüved kasvavad pigem kõrgemaks, mis näitab väga tugevat adhesiooni libisemise asemel (Joonis 15). Tõenäoliselt on *FLO11* üleekspressiooni tulemusel Flo11 tase raku pinnal sedavõrd kõrge, et seda ei jõuta ankru küljest lahti lõigata või Flo11 ei jõua rakkudel eest ära voolata ning seeläbi koloonia libisemine väheneb. See juhtub nii *rho*-mutantide kui ka metsiktüüpi matjate kolooniate puhul.

Üheks töö eesmärgiks oli analüüsida Rim101 raja aktiivsust kasutades qRT-PCR meetodit. Rim101 raja sihtmärgid *NRG1* ja *SMP1* valiti Teresa Lamb ja Aaron Mitchell 2003. aastal ilmunud töö põhjal. Rim101 olemasolu represserib nii *NRG1* kui ka *SMP1* ekspressiooni. Kontrolliks kasutatud $\Delta rim101$ tüve puhul tõusis *NRG1* ekspressioon üle 8 korra ja *SMP1* ekspressioon peaaegu 80 korda võrreldes logaritmilises kasvufaasis olevate metsiktüüpi rakkudega. Vähemalt üks nendest sihtmärkidest ei ole matja struktuuriga kolooniates Rim101 aktiivsuse mõõtmiseks siiski kasutuskõlblik, kuna nende ekspressioon avaldub logaritmilises kasvufaasis ja matjas koloonias erinevalt. *NRG1* ekspressioon matjates kolooniates nii metsiktüüpi kui ka *rho*-mutantidel on oluliselt kõrgem logaritmilises kasvufaasis metsiktüüpi rakkudest. *SMP1* on nendel puhkudel keskmiselt 2 korda madalam kui logaritmilises kasvufaasis metsiktüüpi rakkudel. Probleemi lahenduseks tuleks valida Rim101 rajale uus sihtmärk, mis on spetsiifilisem.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös analüüsiti libisevat kasvu *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA defektsetes tüvedes poolvedelal söötmel. Püüti välja selgitada *rho*-mutantide matja struktuuriga koloonia fenotüübi erinevuse põhjuseid. Töös analüüsiti *S. cerevisiae* mitmerakulisi kasvuvorme mõjutavaid signaaliülekanekanderadu (MAPK, cAMP-PKA, RTG ja Rim101), kontrolliti mitokondriaalse membraanipotentsiaali ja pH mõju libisevale kasvule. Uuriti geneetilist interaktsiooni deletsioonide, mis metsiktüüpi tüves põhjustavad hüpermatjat kolooniat ja *rho*-mutantide vahel. Lisaks mõõdeti *NRG1*, *SMP1*, *CIT2* ja *FLO11* ekspressiooni matja kasvuga koloonia eristuvates rakupopulatsioonides nii metsiktüüpi tüves kui ka *rho*-mutantides.

Tulemused täitavad, et *rho*-mutantide poolt moodustatud matja kasvuga kolooniad (PS: -44) erinevad metsiktüübist väga oluliselt. Et uurida, kas *rho* tüvede matja kasvu defekti põhjustab nende aeglasem kasv võrreldes metsiktüübiga, uuriti nende libisevat kasvu 36 päeva jooksul. Selgus, et 36. päevaks on *rho*-mutantide moodustatud matjad kolooniad pindala poolest võrdsed 3-4 päeva kasvanud metsiktüüpi kolooniaga. Sellest järeldub, et aeglane kasv pole *rho* tüvede matja kasvu defekti põhjus.

Topeltnutantide analüüsist selgus, et positiivne efekt on MAPK raja transkriptsiooniaktivaatori *TEC1* deletsioonil (PS: -39) ning metsiktüüpi tüves hüpermatjat kasvu põhjustav *MSC7* deletsioonil (PS: -34). Negatiivselt mõjub cAMP-PKA rajas oleva *FLO11* repressori Sfl1 deletsioon (PS: -51) ja *RAM1* deletsioon (PS: -51), mis on metsiktüüpi tüves näidatud kui hüpermataja struktuuri tekkepõhjus.

Geeniekspressiooni mõõtmise tulemustest järeldub, et *rho*-mutantide hüpomatja koloonia (PS: -44) moodustumise üks põhjuseid on *FLO11* madal ekspressioonitase, mis on *rho* matjas koloonias piirkonniti üle 10 korra madalam kui metsiktüüpi tüves. *FLO11* üleekspressioon ei taasta matjat kasvu *rho*-mutantides nagu on näha *Δsfl1* tüves, vaid soodustab rakkude liigset adheseerumist, mis takistab libisemist.

Mitokondriaalne membraanipotentsiaal, mis *rho*-mutantides on madalam kui metsiktüüpi rakkudes, on üheks defektse matja kasvu põhjuseks *rho*-mutantides.

Hüperaktiivne F1-ATPase Atp1 subühik *rho* tüves vähendab selgelt libiseva kasvu defekti (PS: -35) kuid ei taasta seda metsiktüüpi rakkude tasemele.

The role of dysfunctional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* mat formation

Kaarel Kruuse

SUMMARY

On semi-solid (0,3%) agar Petri dishes yeast *Saccharomyces cerevisiae* can form complex structures called mats as a result of sliding motility, which depends on the cell surface glycoprotein Flo11. Strains with dysfunctional or missing mtDNA show great defect in mat formation compared to wild type.

The aim of this study was to investigate the role of dysfunctional mitochondria in mat formation. For this purpose several conserved signalling pathways were analysed and gene expression was measured from different cell subpopulations of the colony. The effect of mitochondrial membrane potential and pH of the medium were analysed.

The defective sliding motility in *rho* mutants is not caused by their slow growth. *Rho* mats never achieve the dimensions of wild type strain.

Gene expression analysis show that the level of *FLO11* in mats formed by *rho* strains is more than 10 times lower than in some regions of the wild type mat. Overexpression of *FLO11* doesn't improve defective phenotype as can be seen in Δ *sfl* strain.

One of the reasons for defective mat formation is the loss of mitochondrial membrane potential in *rho* mutants. To investigate this, a mutation in *Atp1* (*ATP1-III*) was introduced into *rho* strains, which resulted in hyperactive *Atp1* and it partially restored mitochondrial membrane potential.

To conclude, it is very likely that there are several causes why dysfunctional mitochondria affects mat formation, because 688 genes have been isolated, which play a role in mat formation.

TÄNUAVALDUSED

Töö autor soovib tänada oma juhendajat, Tiina Tamme, igakülge osutatud abi, konstruktiivse kriitika ja pingelistel hetkedel kaasaelamise eest.

KIRJANDUSE LEOTELU

- Aun A, Tamm T, Sedman J. 2013. Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193: 467-81
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14(2):115-132
- Bruckner S, Mosch HU. 2012. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 36: 25-58
- Cap M, Stepanek L, Harant K, Vachova L, Palkova Z. 2012. Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Molecular cell* 46: 436-48
- Castrejon F, Gomez A, Sanz M, Duran A, Roncero C. 2006. The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryotic cell* 5: 507-17
- Chavel CA, Dionne HM, Birkaya B, Joshi J, Cullen PJ. 2010. Multiple signals converge on a differentiation MAPK pathway. *PLoS genetics* 6: e1000883
- Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, et al. 1998. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 17: 3326-41
- Cullen PJ, Schultz J, Horecka J, Stevenson BJ, Jigami Y, Sprague GF, Jr. 2000. Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* 155: 1005-18
- Cullen PJ, Sprague GF, Jr. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13619-24
- Cullen PJ, Sprague GF, Jr. 2012. The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190: 23-49
- Davis D. 2003. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Current genetics* 44: 1-7
- Dejean L, Beauvoit B, Bunoust O, Guerin B, Rigoulet M. 2002. Activation of Ras cascade increases the mitochondrial enzyme content of respiratory competent yeast. *Biochemical and biophysical research communications* 293: 1383-8

- de Zamaroczy, M., Bernardi, G. (1986) The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Gene* 47(2-3):155-77
- Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 71: 282-94
- Dujon, B. 1981. Mitochondrial genetics and function, p. 505–635. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Ephrussi B, de Margerie-Hottinguer H, Roman H. 1955. Suppressiveness: A New Factor in the Genetic Determinism of the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 41: 1065-71
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 440: 325-31
- Francis BR, White KH, Thorsness PE. 2007. Mutations in the Atp1p and Atp3p subunits of yeast ATP synthase differentially affect respiration and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39: 127-44
- 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: 1077-90
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 63-7
- Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22):12158-12163.
- Granek JA, Magwene PM. 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS genetics* 6: e1000823
- Hansen EC (1883) Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. V. Méthodes pour obtenir des cultures pures de *Saccharomyces* et de microorganismes analogues. *CR Trav Lab Carlsb* 2: 92–105
- He B, Chen P, Chen SY, Vancura KL, Michaelis S, Powers S. 1991. RAM2, an essential gene of yeast, and RAM1 encode the two polypeptide components of the farnesyltransferase that prenylates a-factor and Ras proteins. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:
11373-7

- Jung V, Chen L, Hofmann SL, Wigler M, Powers S. 1995. Mutations in the SHR5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* suppress Ras function and block membrane attachment and palmitoylation of Ras proteins. *Molecular and cellular biology* 15: 1333-42
- Karunanithi S, Vadaie N, Chavel CA, Birkaya B, Joshi J, et al. 2010. Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Current biology : CB* 20: 1389-95
- Kron SJ. 1997. Filamentous growth in budding yeast. *Trends in microbiology* 5: 450-4
- Lai CY, Jaruga E, Borghouts C, Jazwinski SM. 2002. A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162: 73-87
- Lamb TM, Mitchell AP. 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 23: 677-86
- Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. 2007. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques* 42: 71-5
- Lesage P, Yang X, Carlson M. 1996. Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and cellular biology* 16: 1921-8
- Liu Z, Butow RA. 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annual review of genetics* 40: 159-85
- Lorenz MC, Pan X, Harashima T, Cardenas ME, Xue Y, et al. 2000. The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154: 609-22
- Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* 50(5):325-328.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology : CB* 16: R551-60
- Miceli MV, Jiang JC, Tiwari A, Rodriguez-Quinones JF, Jazwinski SM. 2011. Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan. *Frontiers in genetics* 2: 102

- Mortimer RK, Johnston JR. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35-43
- Palkova Z, Vachova L. 2006. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS microbiology reviews* 30: 806-24
- Posas F, Saito H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO journal* 17: 1385-94
- Reynolds TB, Fink GR. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878-81
- Reynolds TB, Jansen A, Peng X, Fink GR. 2008. Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryotic cell* 7: 122-30
- Robertson LS, Fink GR. 1998. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13783-7
- Rose F, PH Winston (1990) *Methods in yeast genetics, a laboratory course* Annal. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Ryan O, Shapiro RS, Kurat CF, Mayhew D, Baryshnikova A, et al. 2012. Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth. *Science* 337: 1353-6
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- 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: 2103-15
- Smets B, Ghillebert R, De Snijder P, Binda M, Swinnen E, et al. 2010. Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 56: 1-32
- Thompson DA, Stahl FW. 1999. Genetic control of recombination partner preference in yeast meiosis. Isolation and characterization of mutants elevated for meiotic unequal sister-chromatid recombination. *Genetics* 153(2):621-641.
- Traven A, Janicke A, Harrison P, Swaminathan A, Seemann T, Beilharz TH. 2012. Transcriptional profiling of a yeast colony provides new insight into the heterogeneity of multicellular fungal communities. *PloS one* 7: e46243
- Ullah A, Orij R, Brul S, Smits GJ. 2012. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 78: 8377-87

Van Mulders SE, Christianen E, Saerens SM, Daenen L, Verbelen PJ, et al. 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 9: 178-90

Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nature reviews. Microbiology* 2: 533-40

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerid deletsioonitüvede

konstrueerimiseks

Nimi	Järjestus 5'-3'	Päritolu
pFa6A check	CTCGACATCATCTGCCAGATG	Tiina Tamm
pYM check	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG	Tiina Tamm
Gpa2 forward	TGCGTGCAGCCTTAGACTGAAG	Käesolev töö
Gpa2 reverse	GTGATGAATGCCTTACCTACTG	Käesolev töö
Gpa2 control forward	TATCCTCTTGCACTACTGCACCG	Käesolev töö
Ram1 forward	CACTTGTCCTCAACGGCCTCACC	Käesolev töö
Ram1 reverse	CAAGCCGATTGATGAGGTACAAC	Käesolev töö
Ram1 control forward	GTAAAGCTCTCTACTGCACAAC	Käesolev töö
Msc7 forward	CTGACATTGCAATCGGTCTTTACG	Käesolev töö
Msc7 reverse	CCACCACCAACTACAGAATCC C	Käesolev töö
Msc7 control forward	GAAAGCAGAGGCTGGTGTGCAAGG	Käesolev töö
Sip4 forward	CGGCTAATCCTCTTTACCATTG	Käesolev töö
Sip4 reverse	GATGGACGGGAATGGGAAGCC	Käesolev töö
Sip4 control forward	GGTGCAATCAAGACTCCGATCC	Käesolev töö
Ssk2 forward	GTGTGAGCTCCGTCTGTCCTTC	Käesolev töö
Ssk2 reverse	CATTAATCCACCTCGACTAGACTTC	Käesolev töö
Ssk2 control forward	GGATACAACCTGCAATGAGTGGAAAC	Käesolev töö
Shr5 forward	GGTCGTAGTTGTCGCAAGCTCG	Käesolev töö
Shr5 reverse	AGCAGCAGAAACAGAGCAAACCAG	Käesolev töö
Shr5 control forward	CTCTGTATCGGTCTGTTCTAACC	Käesolev töö

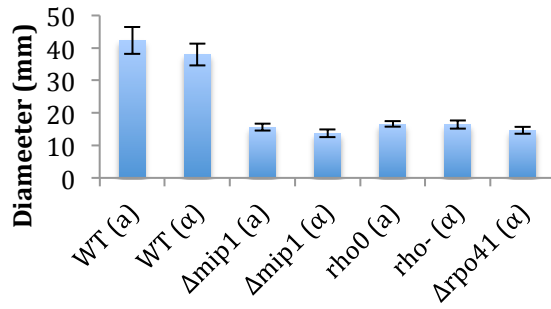
Lisa 2. Töös kasutatud qRT-PCR praimerid

Nimi	Järjestus 5'-3'	Päritolu
Nrg1 forward	AATCGCTGCGTGCATCCCTTAT	Käesolev töö
Nrg1 reverse	TACGTTATCAGATGAGGAAGACCTT	Käesolev töö
Smp1 forward	GGCTTCCCTGAGAGCTTTCCT	Käesolev töö
Smp1 reverse	GGATTTAATGGGACGGGTGACA	Käesolev töö
Flo11 forward	TATACTGCATGATATTTTGCTGGTCC	Anu Aun
Flo11 reverse	TATTGGTCCTTTCGCTTCTATTTAAC	Anu Aun
Cit2 forward	AAATGATGACTACTCTAAAGATACGATCG	Anu Aun
Cit2 reverse	TCATAATCTGGAAAAATGGTCCATGGC	Anu Aun
Ubc6 forward	CAGGAAAATGTAGAGACATTAGAAAAGAG	Anu Aun
Ubc6 reverse	GCTTGTTTCAGCGCGTATTCTGTC	Anu Aun
Taf10 forward	AGGTCTTCCGTAGCGGTATCTAATG	Anu Aun
Taf10 reverse	ATCGTTCACCGTCAGAACAACCTTGC	Anu Aun

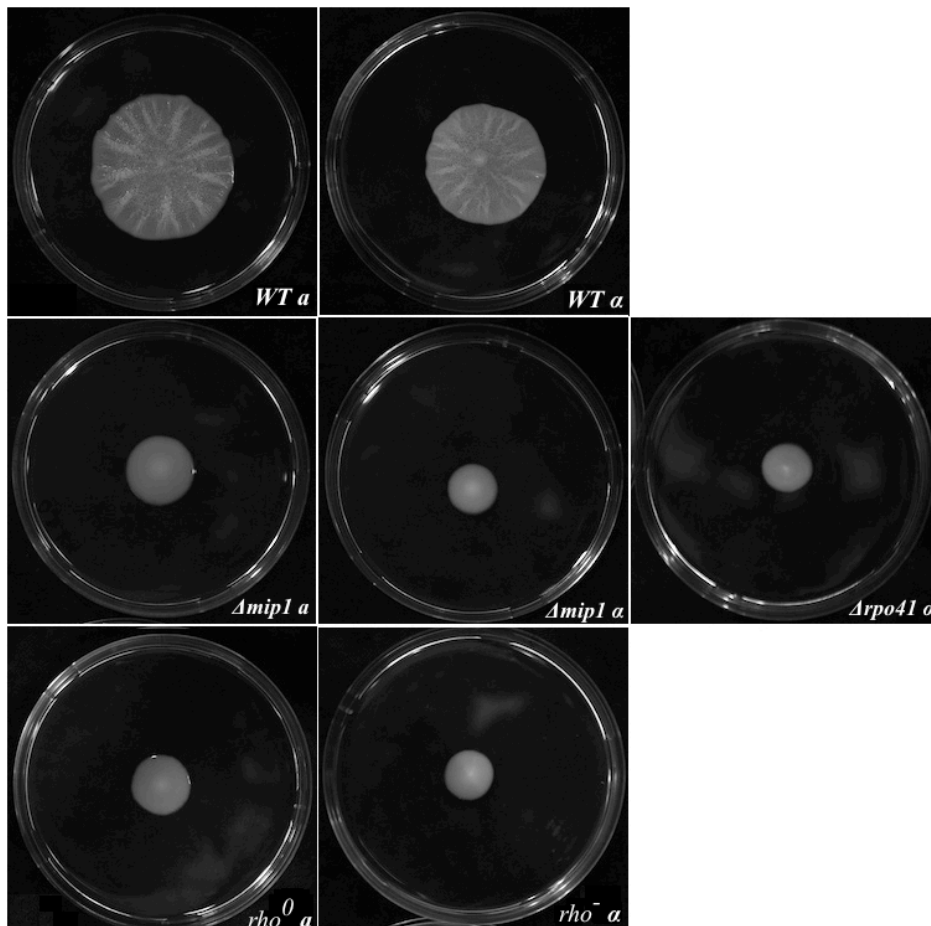
Lisa 3. Metsiktüüpi ja *rho*-mutantide matja kasvu analüüs 5. päeval

(A) 5 päevaste matjate kolooniate diameeter. (B) 5 päeva kasvanud matjad kolooniad.

A

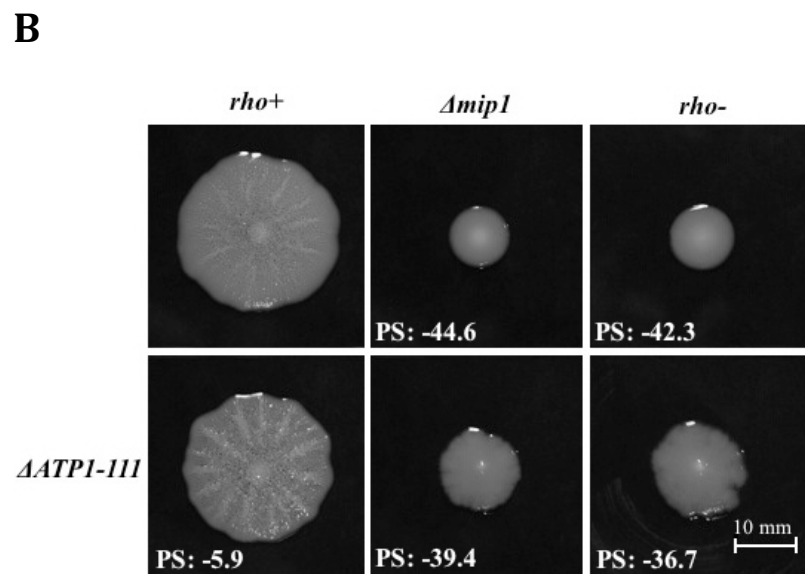
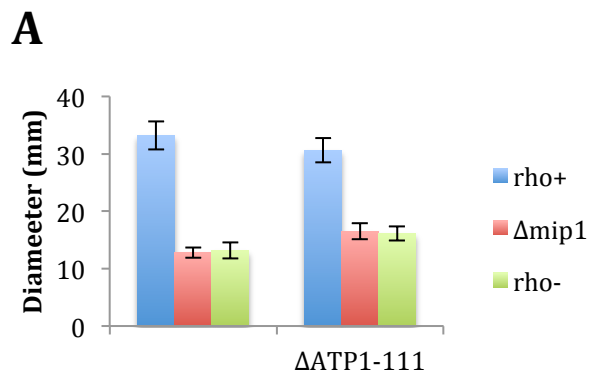


B



Lisa 4. ATP1-111 mutatsiooni mõju ρ^+ , ρ^- ja ρ^0 tüvede 5 päeva kasvanud majatele kolooniatele

(A) 5 päeva kasvanud matja kasvu koloonia diameeter (mm). **(B)** 5 päeva kasvanud kolooniate morfoloogia.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kaarel Kruuse (autori nimi)

sünnikuupäev: 20.10.1988 (sünnikuupäev)

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

“Mittefunktsionaalse mitokondri mõju *Saccharomyces cerevisiae* matja struktuuriga kolooniate kasvule”,

mille juhendaja on Tiina Tamm,

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 **01.09.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 22.08.2013