

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS**  
**AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA**

Ana Vilkova

**Ras/PKA signalinio kelio įtaka [ $PSI^+$ ] priono indukcijai  
mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse**

Baigiamasis magistro darbas

Mokslinis vadovas:  
Prof. dr. D. Čitavičius

**VILNIUS 2006**

# Turinys

<b>Sutrumpinimai.....</b>	<b>4</b>
<b>1.Įvadas.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Literatūros apžvalga.....</b>	<b>7</b>
2.1. Ras/PKA signalinio kelio įtaka .....	7
2.1.1. Pagrindiniai mielių Ras/PKA signalinio kelio komponentai.....	7
2.1.1.1. GPCR sistema (Gpr1-Gpa2).....	9
2.1.1.2. Ras baltymų sistema.....	10
2.1.1.3. Ras baltymų sistema.....	10
2.1.1.4. Grįžtamo ryšio cAMP sintezės inhibicija.....	11
2.1.2. Ras/PKA signalinio kelio taikiniai.....	11
2.1.2.1. Ras/PKA signalinio kelio įtakojamos genų grupės. BENDRAS STRESINIS ATSAKAS.....	12
2.1.2.2. Atsarginių angliavandenių trehalozės ir glikogeno kaupimo reguliacija.....	14
2.1.2.3. Ras/PKA kelio įtaka augimui ir ląstelės proliferacijai.....	16
2.1.3. Kai kurių Ras/PKA signalinio kelio dalyvių mutacijų sąlygojami fenotipai.....	16
2.2. Epigenetiniai elementai ir jų įtaka <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ląstelės funkcijų reguliacijai.....	20
2.2.1. Mielių prionų savybės. Mielių priono koncepcija. ....	20
2.2.2. Fenotipinė mielių prionų išraiška Mielių prionas [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] ir jo fenotipinė išraiška.....	22
2.2.3. [ <i>URE3</i> ] priono fenotipinė išraiška. Azoto katabolinė represija.....	24
2.2.4. [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ] faktorius. Mielių prionų tarpusavio sąveika.....	26
2.2.5. Šaperonų įtaka mielių prionų indukcijai ir plitimui.....	27
2.2.6. Prionų įtaka mielių ląstelės gyvybingumui. Prionų biologinis vaidmuo.....	27
2.3. Signalinio Ras/PKA kelio sąveika su prionais.....	29
<b>3. Medžiagos ir metodai.....</b>	<b>30</b>
3.1. Medžiagos.....	30
3.1.1. Reagentai.....	30
3.1.2. Mielių kamienai.....	30
3.1.3. Terpės.....	31
3.1.4. Tirpalai, buferiai ir kitos priemonės.....	32
3.2. Metodai.....	32
3.2.1. Genetikos metodai.....	32
3.2.2. Ras-PKA signalinio kelio fenotipų analizės metodai.....	33

3.2.3. [PSI <sup>+</sup> ] priono indukcijos analizės metodai.....	33
3.2.4. Mikroskopija.....	34
<b>4. Rezultatai .....</b>	<b>35</b>
4.1. Kamienų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.....	35
4.1.1. 6 kamieno ir jo transformantų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.....	36
4.1.2. 12 kamieno ir jo transformantų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.....	38
4.1.3. 7 kamieno ir jo transformantų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.....	40
4.2. Pradinių kamienų ir jų transformantų gyvybingumo analizė.....	42
4.2.1. Pradinių kamienų ir jų transformantų (įvesti <i>wtCYR1</i> , <i>wtBCY1</i> , <i>RAS2<sup>Val19</sup></i> genai) ląstelių gyvybingumo skirtumai.....	44
4.2.1.1. 6 kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.....	44
4.2.1.2. 12 kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.....	45
4.2.1.3. 7 kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.....	46
4.2.2. YEp24- <i>CYR1</i> transformantų ląstelių gyvybingumo palyginimas.....	47
4.2.3. YEp24- <i>CYR1</i> transformantų ląstelių gyvybingumo tarp kamienų palyginimas.....	48
4.2.4. pXP1- <i>BCY1</i> transformantų ląstelių gyvybingumo palyginimas. ....	49
4.2.5. pMW2- <i>RAS2<sup>VAL19</sup></i> transformantų ląstelių gyvybingumo palyginimas. terpėse.....	49
4.2.6. pMW2- <i>RAS2<sup>VAL19</sup></i> transformantų ląstelių gyvybingumo tarp kamienų palyginimas. ....	50
4.3. Prionizacijos analizė.....	52
4.3.1. Pradinių kamienų (6, 12, ir 7) ląstelių prionizacijos skirtumai. ....	53
4.3.2. Pradinių kamienų ir jų transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.....	53
4.3.2.1. 6 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.....	53
4.3.2.2. 12 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.....	54
4.3.2.3. 7 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.....	54
4.3.3. Tarpkamieninis transformantų prionizacijos dažnių palyginimas.....	54
<b>5. Rezultatų aptarimas.....</b>	<b>56</b>
<b>6. Išvados.....</b>	<b>60</b>
<b>SANTRAUKA.....</b>	<b>61</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>62</b>
<b>Literatūros sąrašas.....</b>	<b>63</b>

## Sutrumpinimai

a ir $\alpha$	poravimosi tipo lokuso alelės
am. r.	aminorūgštis
ATP	adenozintrifosforo rūgštis
BSE	galvijų spongiforminė encefalopatija
DNR	dezoksiribonukleorūgštis
GTP	guanozintrifosforo rūgštis
GuHCl	guanidino hidrochloridas
YPD	turtinga terpė
kDa	kilodaltonas
MAT	poravimosi tipo lokusas
MD	minimali druskų terpė
ml	mililitras
PKA	proteinkinazė A
PrD	prionizacijos domenas
RNR	ribonukleorūgštis
tRNR	transportinė ribonukleorūgštis
UV	ultravioletiniai spinduliai
<i>wt</i>	laukinis tipas
$\Delta$	delecija
GEF	guanino nukleotidų pakaitos faktorius
LRR	leucino pasikartojimais turtingas domenas
CAP	su adenilatciklaze asocijuotas baltymas
GPCR	su G baltymais asocijuoti receptoriai
STRE	promotoriaus <i>cis</i> -reguliacinį elementas (angl. trumpinys - <b>s</b> tress <b>r</b> esponsive <b>e</b> lement)
PDS	promotoriaus <i>cis</i> -reguliacinį elementas (angl. trumpinys – <b>p</b> ost <b>d</b> iauxic <b>s</b> hift),
USA	ureidosukcinatas

Aminorūgštys:	A, Ala	alaninas
	H, His	histidinas
	C, Cys	cisteinas
	I, Ile	izoleucinas
	D, Asp	asparagino rūgštis
	K, Lys	lizinas
	E, Glu	glutamo rūgštis
	L, Leu	leucinas
	F, Phe	fenilalaninas
	M, Met	metioninas
	G, Gly	glicinas
	N, Asn	asparaginas
	T, Thr	treoninas
	P, Pro	prolinas
	V, Val	valinas
	Q, Gln	glutaminas
	W, Trp	triptofanas
	R, Arg	argininas
	Y, Tyr	tirozinas
	S, Ser	serinas

# 1. Įvadas

Ras/PKA signalinis kelias yra vienas svarbiausių ląstelės genetinių reguliatorių, kuris mielėse perduoda informaciją apie maisto medžiagų pasikeitimus ir dalyvauja formuojant ląstelės adaptacines savybes

Patvirtinus mielėse citoplazminius elementus prionus (Wickner, 1994), imta diskutuoti apie jų reikšmę ląstelės adaptyvumui (Chernoff, 2001; Edskes 2001; Uptain, Lindquist, 2002).

Prionai formuojasi ląstelės molekulinėje aplinkoje, veikiami genetinių ir epigenetinių faktorių ir savo ruožtu patys gali keisti jų veiklą. Tačiau, nėra aišku, kokios molekulinės ląstelės sistemos turi reikšmės prionų formavimuisi ir kaip jos šį procesą veikia. Pastaruoju metu pradedami tyrimai, nagrinėjantys signalinių sistemų įtaką mielių prionams. Patvirtintas vienas faktas, rodantis, kad nuo Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo priklauso mielių [*URE3*] priono indukcija (Edskes, Wickner, 2000). Galima šio kelio įtaka kito gerai žinomo [*PSI*<sup>+</sup>] priono formavimuisi gali būti numanoma iš natyvaus Sup35 baltymo struktūros, kuri turi spėjama Ras/PKA kelio reguliuojamos proteinkinazės A fosforilavimo taikinį (Kikuchi ir kt., 1988). Taip pat Ras/PKA reguliuojami genetiniai faktoriai, pvz., šaperonai, kurie veikia prionų formavimąsi (Chernoff, 2001), bei skirtingų prionų sąveika (Derkatch ir kt., 2001) rodo galimą netiesioginę šio kelio įtaką prionams.

Iki šiol nėra pakankamai aišku, kokios priežastys skatina spontaniškus prionų atsiradimą bei plitimą. Taigi nenuostabu, kad yra pradėta nagrinėti Ras/PKA signalinio kelio įtaka prionų indukcijai ir plitimui.

## **Darbo tikslas**

Nustatyti galimą atskirų Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažniui mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse.

## 2. Literatūros apžvalga

### 2.1. Ras/PKA signalinio kelio įtaka

#### *Saccharomyces cerevisiae* mielių ląstelių metabolizmui

Proliferuojančiose *Saccharomyces cerevisiae* mielių ląstelėse Ras/PKA signalinis kelias reguliuoja daug gyvybiškai svarbių procesų – aplinkos mitybinių išteklių jutimą, ląstelės proliferaciją, atsarginių angliavandenių kaupimą, streso atsaką. Kelio svarbą gerai iliustruoja mutavusių mielių ląstelių, kuriuose yra pakitęs Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas, fenotipai. Sumažinto kelio aktyvumo mielių mutantai net turtingoje terpėje elgiasi kaip bado sąlygomis, sustabdo ląstelės ciklą. Tai gali būti susiję su cAMP įtaka G1 ciklinų genų transkripcijai. Padidinto Ras/PKA kelio aktyvumo mielių mutantuose situacija yra priešinga – ląstelės negali sustabdyti dalinimosi ciklo G1 taške bado sąlygomis, jos neadekvačiai reaguoja į mitybinių išteklių apribojimą. Tačiau pastebėta, kad minėti mutantai nustoja proliferuoti azotinio bado sąlygomis, nebegali užbaigti esamo dalinimosi ciklo ir sustabdo jį skirtinguose taškuose (Igal, Estruch, 2000).

#### 2.1.1. Pagrindiniai mielių Ras/PKA signalinio kelio komponentai

Signalinį kelią sudaro šerdies elementai Cdc25, Ras baltymai, adenilatciklazė, proteinkinazė A (PKA), taip pat komponentai, tiesiogiai sąveikaujantys su šerdimi – Ira baltymai, Cap/Srv2 ir dvi fosfodiesterazės. Su G baltymais asocijuoto ląstelės receptoriaus sistema, sudaryta iš Gpr1p receptoriaus ir Ga baltymo Gpa2p (Gpr1-Gpa2) aktyvuoja adenilatciklazę kai terpėje susidaro pakankama gliukozės koncentracija. Ši gliukozės indukuojama cAMP sintezė rodo, kad Gpr1p atlieka gliukozės receptoriaus funkciją mielių ląstelėje (Thevelein, de Winde, 1999).

Mielių Ras genai, *RAS1* ir *RAS2*, buvo išskirti hibridizacijos būdu kaip zondą panaudojus žinduolių *ras* geną. Jie yra labai konservatyvūs. Jų N-galinė sritis pasižymi 80% homologija žinduolių analogui, tuo tarpu C-galinė sritis labiau skiriasi ir yra ilgesnė (Thevelein, 1992).

Mielėse Ras baltymai veikia kaip adenilatciklazės Cyr1p aktyvatoriai, funkciniai žinduolių G<sub>s</sub> baltymų analogai. Kitaip sakant, katalizuoja cAMP, antrinio informacijos nešėjo, būtino ląstelės išgyvenimui sintezę adenilatciklaze (Thevelein, 1992).

Ras baltymai gali būti dvejopos būsenos: aktyvūs - kai yra prisijungę GTP arba neaktyvūs - kai prisijungę GDP (Kido ir kt., 2002).

*IRA1* ir *IRA2* genų produktai stimuliuoja Ras baltymų GTPazinį aktyvumą, tokiu būdu veikia kaip Ras/PKA signalinio kelio inhibitoriai. CDC25 geno produktas veikia kaip Ras baltymų guanino nukleotidų pakaitos faktorius GEF (angl. trumpinys – **g**uanine nucleotide

exchange factor). Cdc25p stimuliuoja GDP pakeitimą į GTP, todėl yra Ras/PKA signalinio kelio aktyvatorius (pav.1). Tiek Ras baltymai, tiek Cdc25p būtini pakankamo cAMP lygio palaikymui ląstelėje (Thevelein, 1994).

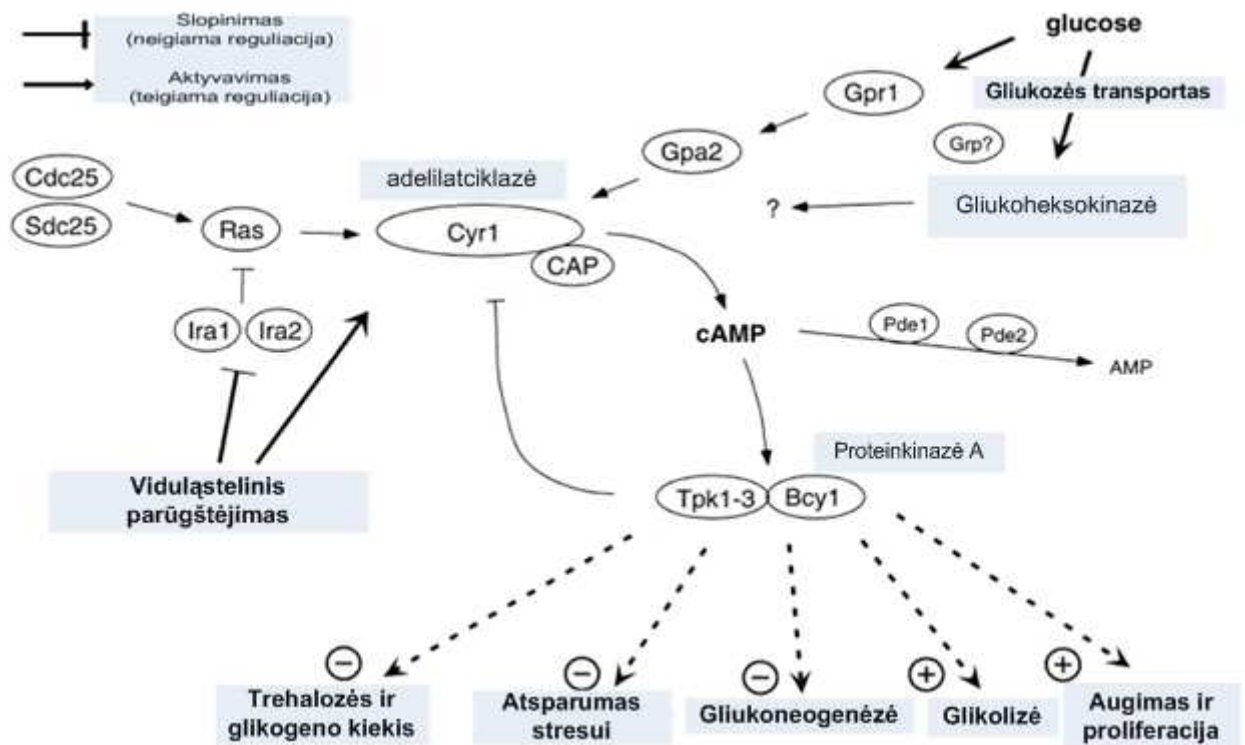
cAMP sintetinantį fermentą adenilciklazę Cyr1p koduoja *CYR1/CDC35* genas. Mielių *S. cerevisiae* Cyr1p adenilciklazė sudaryta iš 2026 amino rūgščių liekanų. Baltymo struktūroje išskiriamos šios keturios funkcinės sritys:

- N-galinis domenas, kuris veikia kaip katalitinio domeno reguliatorius-slopiklis;
- centrinis domenas su leucinu turtingais (23 amino rūgščių liekanų ilgio) pasikartojimais, dar vadinamas LRR (angl. trumpinys – **l**eu**c**in **r**ich **r**epeat) domenu. (mutacijos šiame domene sutrikdo adenilciklazės RAS2-priklausomą aktyvavimą);
- katalitinis domenas;
- C-galinis domenas (Kido ir kt., 2002).

C-galiniame domene esančios CAP surišančios sritys dėka adenilciklazė suformuoja kompleksą su 60kDa CAP (angl. trumpinys –adenylyl **c**yclase-**a**sociated **p**rotein) baltymu, kurį koduoja *SRV2/CAP* genas. CAP baltymas yra multifunkcinis. Jo N galinis domenas tarnauja Ras/PKA signalinio kelio funkcionavimui, tuo tarpu C-galinė sritys susijusi su aktino citoskeleto reguliacija (Kido ir kt., 2002; Thevelein, 1992).

Adenilciklazė Cyr1p gali būti aktyvuojama skirtingais keliais:

- a) GPCR (su G baltymais asocijuoti receptoriai) sistemos (Gpr1-Gpa2p) keliu;
- b) GTPazėmis Ras1/2p (1 pav.).



Pav. 1. Ras/PKA signalinio kelio veikimo modelis (Thevelein, de Winde, 1999).



cAMP koncentracijos padidėjimas ląstelės citoplazmoje yra trumpalaikis reiškinys, tačiau jo trukmės pakanka signalo perdavimui. Perteklinis cAMP kiekis tuoj pat suskaldomas žemo ir aukšto afiniškumo fosfodiesterazių (1 pav.), atitinkamai koduojamų *PDE1* ir *PDE2* genuose. Pde2p fosfodiesterazės  $K_m$  konstanta yra tos pačios eilės kaip cAMP koncentracija citozolyje. *PDE2* geno delecija sąlygoja padidinto Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo fenotipo atsiradimą. Pde1p žemo afiniškumo fosfodiesterazės  $K_m$  yra visa eile didesnė nei citozolinio cAMP koncentracija, todėl *PDE1* geno delecija signalinio kelio aktyvumo neįtakoja (Thevelein, 1994).

Padidėjęs cAMP kiekis ląstelėje aktyvuoja nuo cAMP priklausomą proteinkinazę A (PKA), kurios holofermentas sudarytas iš dviejų vienodų inhibuojančių reguliacinių subvienetų (koduoja *BCY1* genas) ir dviejų katalitinių subvienetų, kuriuos koduoja *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* genai. PKA fosforilina baltyminių substratų serino arba treonino amino rūgščių liekanas, esančias tam tikrose specifinėse sekose. Priklausomai nuo augimo sąlygų PKA lokalizacija keičiasi: aktyviai fermentuojančiose ląstelėse PKA daugiausia kaupiasi branduolyje, kvėpuojančiose arba stacionarios fazės ląstelėse ji tolygiai pasiskirsto branduolyje ir citoplazmoje. Bcy1p subvienete yra dvi cAMP surišimo sritys. cAMP jungiasi su PKA regulatoriniu subvienetu Bcy1p, ko pasekoje išsilaisvina proteinkinazės katalitiniai subvienetai Tpk1/2/3p ir fosforilina substratus (1 pav.). Taipogi jie dalyvauja grįžtamo ryšio cAMP sintezės inhibicijoje (Igual, Estruch, 2000; Thevelein, 1994).

### **2.1.1.2. GPCR sistema (Gpr1-Gpa2)**

GPCR sistemą sudaro Gpr1 ir Gpa2 baltymai. Ši sistema aktyvuoja adenilatciklazę reaguodama į gliukozę terpėje. Tokiu būdu Gpr1p veikia kaip gliukozės receptorių, nors kituose eukariotuose GPCR sąveikauja su plačiu ligandų spektru – su hormonais, neurotransmitteriais, feromonais, taip pat reaguoja į šviesą.

*GPA2* genas yra homologiškas žinduolių heterotrimeriniams  $G\alpha$  baltymams. Geno padidinta raiška pakeičia cAMP lygį ląstelėje, bet jo delecija gliukozės indukuoto cAMP signalo nepanaikina visiškai, o tik susilpnina. Atitinkamai sumažėja ir PKA aktyvumas (Colombo ir kt., 1998).

Gpa2p įtaka pseudohifiniam augimui patvirtina Gpa2p poveikį cAMP metabolizmui – *GPA2* delecija susilpnina pseudohifų formavimąsi, bet šis defektas kompensuojamas cAMP lygį atstatančiomis sąlygomis. Parodyta, kad Gpa2p dalyvauja pseudohifinio augimo reguliacijoje azoto bado sąlygomis, kuris taipogi reguliuojamas cAMP, nors nėra įrodymų, jog azotinis badas mažintų cAMP lygį ląstelėje (Thevelein, de Winde, 1999).

Augimo bei atitinkamų PKA kontroliuojamų charakteristikų tyrimai atlikti su *gpr1Δgpa2Δ* mielių kamienais, o taipogi faktas, kad *GPA2* delecija yra letali jei yra inaktyvuotas ir *RAS2* genas gerai iliustruoja Gpa2p kaip adenilciklazės stimulatoriaus vaidmenį.

*GPR1* delecija sutrikdo gliukozės indukuotą cAMP signalo perdavimą, tačiau jos įtaka PKA taikiniams parodyta tik augimo esant gliukozei metu. PKA kontroliuojamos diaukšinio augimo charakteristikos neįtakojamos (Colombo ir kt., 1998).

Tam, kad gliukozė indukuotų cAMP signalą, ji turi būti fosforilinta, tačiau svarbu atskirti fosforilinimo būtinumą nuo Gpr1-Gpa2 sistemos aktyvavimo. Manoma, jog cAMP kelio aktyvavimui reikia dviejų sąlygų: ekstraląstelinio gliukozės detektavimo Gpr1-Gpa2 sistemos pagalba ir viduląstelinio gliukozės buvimo nustatymo, kuris priklauso nuo gliukozės fosforilinimo (Thevelein, de Winde, 1999).

### 2.1.1.3. Ras baltymų sistema

Žinomos dvi sąlygos, dėl kurių vegetatyvinėje mielių ląstelėje staigiai padidėja cAMP koncentracija (Thevelein, 1991):

- Pridėjus greitai fermentuojamo angliavandens (gliukozės) į derepresuotą (auginamą terpėje su nefermentuojamais anglies šaltiniais) ląstelių terpę detektuojamas laikinas, bet smarkus cAMP koncentracijos padidėjimas-pikas, kuris greitai išnyksta. Parodyta, kad bazinis cAMP koncentracijos lygis yra panašus tiek auginant mielų kultūrą su gliukoze, tiek su nefermentuojamais anglies šaltiniais (pavyzdžiui, etanolis, glicerolis arba acetatas) kai ląstelės yra derepresuotos ir įsisavina anglį kvėpuodamos.
- Antras atvejis yra viduląstelinis parūgštėjimas, kuris sąlygoja ilgiau trunkantį cAMP koncentracijos piką.

GTP/GDP santykio matavimai Ras baltymuose viduląstelinio rūgštėjimo atveju rodo staigų Ras baltymų praturtinimą GTP nukleotidais. Šis GTP koncentracijos padidėjimas nepriklauso nuo Cdc25p ir Sdc25p. Manoma, GTP/GDP santykis išauga dėl Ira baltymų funkcijos inhibavimo. Pridėjus gliukozės derepresuotoms ląstelėms tokio GTP/GDP santykio pokyčio Ras baltymuose neaptikta. Šie faktai patvirtina prielaidą, kad Ras baltymai nedalyvauja gliukozės iššaukto cAMP signalo perdavime (Colombo ir kt., 1998).

Gliukozė pati sąlygoja viduląstelinio pH mažėjimą, bet ji nuslopinus gliukozės iššauktas cAMP signalas vis tiek generuojamas. Šio viduląstelinio parūgštėjimo vaidmuo, manoma susijęs su atsarginių angliavandenių skaldymu atstatant ATP lygį anglies bado metu. Kai terpėje trūksta anglies šaltinio, ATP kiekio mažėjimas sąlygoja ir viduląstelinio pH kritimą, ko pasekoje stimuliuojama cAMP sintezė, ir trehalozės bei glikogeno mobilizaciją, o suaktyvėję fermentacija

bei kvėpavimas atstato ATP. Kaip matome viduląstelinio rūgštėjimo aktyvuoti Ras baltymai leidžia mielėms greičiau adaptuotis bado sąlygomis (Colombo ir kt., 1998).

Mutantiniai Ras baltymai, pavyzdžiui, Ras<sup>2<sup>ile152</sup></sup>, kurie negali būti nukreipti link plazminės membranos, palaiko ląstelės gyvybingumą, bet ne gliukozės generuojamą cAMP signalą. RAS<sup>2<sup>val19</sup></sup> alelis irgi nepalaiko gliukozės sąlygoto cAMP signalo, bet šiuo atveju dėl pastoviai aukštos cAMP koncentracijos ląstelėje (Colombo ir kt., 1998).

Parodyta, kad gliukozės ir viduląstelinio parūgštėjimo sąlygotam cAMP sintezės stimuliavimui reikalingi tiek Ras, tiek ir Cdc25 baltymai (Thevelein, 1991). Cdc25p inaktyvavimas stipriai sumažina su membrana sujungtos adenilatciklazės kiekį. RAS genų delecija tai pat sąlygoja citoplazminę adenilatciklazės lokalizaciją, bet jei tuo pat metu indukuojama padidinta Cdc25 raiška, padėtis pasitaiso, adenilatciklazė atsiduria savo vietoje prie membranos. Šie faktai paaiškina Cdc25-Ras inaktyvacijos poveikį gliukozės sąlygoto cAMP signalo palaikymui – jie neperduoda signalo, bet užtikrina tinkamą adenilatciklazės lokalizaciją bei bazinio cAMP sintezės lygio palaikymą. Adenilatciklazės aktyvumas didžiaja dalimi priklauso nuo GTP-Ras komplekso aktyvumo – nesant Ras baltymų adenilatciklazė sugeba sintetinti pakankamą gyvybingumui užtikrinti cAMP kiekį tik kamienuose su dviguba fosfodiesterazių delecija (Thevelein, de Winde, 1999).

#### **2.1.1.4. Grįžtamo ryšio cAMP sintezės inhibicija**

Svarbus Ras/PKA kelio taikyns yra pati cAMP sintezė. Kamienuose su dviguba fosfodiesterazių delecija cAMP lygis nedaug viršija normą. Proteinkinazė A vykdo labai griežtą grįžtamo ryšio cAMP sintezės inhibiciją. Tikėtina, kad inhibuojamas pačios Cyr1p adenilatciklazės aktyvumas. Be to, viena iš fosfodiesterazių – Pde1p – taip pat yra PKA aktyvumo taikyns.

Žemo afiniškumo fosfodiesterazės Pde1p delecija ir padidinta raiška stipriai įtakoja cAMP signalo perdavimą ir tuo pat metu mažai veikia bazinį cAMP lygį. Aukšto afiniškumo fosfodiesterazės Pde2p atvirkščiai, silpnai veikia cAMP signalą, ir pasižymi didele įtaka bazinio cAMP lygio užtikrinimui. Proteinkinazės A aktyvuoja fosfodiesterazę Pde1p fosforilindama Ser-252 padėtyje, todėl tikėtina Pde1p dalyvauja grįžtamo ryšio cAMP sintezės inhibicijoje (Thevelein, de Winde, 1999).

#### **2.1.2. Ras/PKA signalinio kelio taikiniai.**

Ras/PKA signalinis kelias vaidina svarbų vaidmenį ląstelės metabolizme, reguliuoja stresinį atsaką ir proliferaciją atsižvelgiant į esamus mitybinius išteklius.

Tikėtina, kad gliukozės indukuoto signalo perdavimo Ras/PKA keliu funkcija yra efektyvus gliukoneogenezės/kvėpavimo metabolizmo perjungimas į fermentaciją. Tam, kad gliukozė indukuotų cAMP kiekio padidėjimą dukart, jos koncentracija terpėje turi būti ne mažesnė kaip 15-20mM. Esant mažesnei koncentracijai gliukozė oksiduojama, bet nefermentuojama. Tokiu būdu signalinis kelias aktyvuojamas tik esant terpėje pakankamam fermentuoti gliukozės kiekiui. Gliukozės terpėje augančiose ląstelėse PKA aktyvumas didesnis nei ląstelėse, augančiose terpėje su nefermentuojamu anglies šaltiniu. Kai derepresuotų ląstelių (stacionarios fazės ląstelės, arba ląstelės augančios nefermentuojamo anglies šaltinio terpėje) aplinkoje atsiranda gliukozės, aktyvuota proteinkinazė A sukelia laikinus pokyčius kai kuriose mielių ląstelės sistemose:

- a) Atsarginių angliavandenių trehalozės ir glikogeno metabolizme (pakinta glikogensintazės, glikogenfosforilazės ir trehalazės aktyvumai) ;
- b) Glikolizėje ir gliukoneogenezėje – reguliaciniai glikolizės fermentai aktyvuojami, o gliukoneogenezės – inhibuojami (aktyvuojama fosfofruktokinazė. 2, inhibuojama fruktozės-1,6-bifosfatazė, sustabdoma alkoholio dehidrogenazės II raiška fosforilinant transkripcijos faktorių Adr1p) (Iguar, Estruch, 2000; Thevelein, 1994).

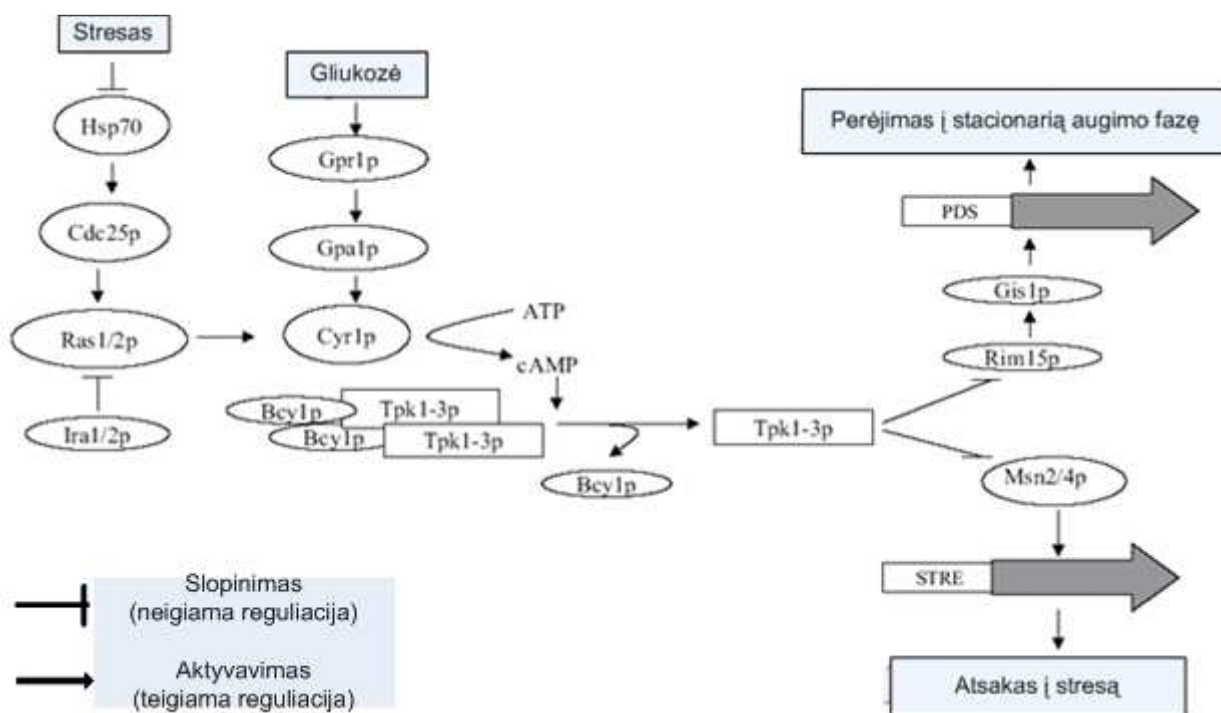
### **2.1.2.1. Ras/PKA signalinio kelio įtakojamos genų grupės.**

#### **BENDRAS STRESINIS ATSAKAS.**

Optimalaus augimo sąlygomis Ras/PKA signalinio kelio nuslopinamų genų grupės yra aktyvuojamos įvairių stresų metu. Pastebėtas ryšys tarp PKA aktyvumo ir ląstelės termotolerantiškumo. Sumažinto PKA aktyvumo mielių kultūros yra atsparesnės šiluminiams šokui ir atvirkščiai. Pastebėta, kad kai kurių šaperonų genų bazinė ir indukuota raiška sustiprėja *ras2* mutantuose su sumažintu PKA aktyvumu, ir atvirkščiai, stipriai sumažėja *bcy1* mutantuose, kurie pasižymi pastoviu aukštu PKA aktyvumu. Manoma, egzistuoja integruotas valdymo mechanizmas – BENDRAS STRESINIS ATSAKAS, kurio paskirtis būtų įvairių streso formų atpažinimas ir atitinkamų gynybinių modulių aktyvavimas (Iguar, Estruch, 2000).

Daugelis genų indukuojamų įvairių stresų turi savo promotoriuose tam tikrą *cis*-reguliacinį elementą, vadinamą STRE (angl. trumpinys - **s**tress **r**esponsive **e**lement) dėžute. STRE dėžutės šerdyje randama labai konservatyvi nukleotidų seka AGGGG. Mielių genomo analizė atskleidė net 186 potencialius STRE genus. Šis reguliacinis elementas funkcionuoja abiem orientacijomis ir yra absoliučiai būtinas atitinkamų stresinio atsako genų aktyvavimui. Be to, STRE elementas yra Ras/PKA signalinio kelio slopinimo taikiny (2 pav.) (Iguar, Estruch, 2000).

STRE genų raiškoje taip pat dalyvauja ir *trans*-veiksniai, pavyzdžiui du „zinko pirštų“ motyvą turintys Msn2p ir Msn4p baltymai, specifiskai prisijungiantys prie STRE sekos (2 pav.). Parodyta, kad šių transkripcijos faktorių prisijungimas suintensyvėja streso metu ir tai susiję su šių baltymų kaupimusi branduolyje. Ras/PKA signalinio kelio įtaka STRE genų raiškai susijusi su kelio poveikiu Msn2/4p lokalizacijai. Msn2p sekoje yra PKA fosforilinimo saitai, kurių mutacijos leidžia transkripcijos faktoriui laisvai kauptis branduolyje (Iguar, Estruch, 2000).



Pav. 2. Ras/PKA signalinio kelio ir jo taikinių sąveikų principinė schema (Iguar, Estruch, 2000)

Kokiu laipsniu Msn2/4p paveikia STRE genų indukciją šiluminio šoko atveju yra diskutuotinas klausimas. Yra genų, kurių indukcija šiluminiu šoku visiškai panaikinama *msn2* mutanto ląstelėse. Tačiau daugelio STRE genų šiluminio šoko indukcija tik susilpnėja šiuo atveju ir visiškai sutrinka tikrai *msn2msn4* dvigubo mutanto ląstelėse. Taip pat yra genų, pavyzdžiui, *PDE2*, kurių indukcija šiluminiu šoku *msn2* mutanto ląstelėse nepakinta, ir yra susilpnėjusi *msn2msn4* dvigubo mutanto atveju. Pastebėta, jog Msn2/4p vaidmuo STRE genų aktyvacijoje priklauso nuo streso rūšies: jų buvimas nėra būtinas osmosinio streso atveju (Iguar, Estruch, 2000).

STRE elemento buvimas promotoriuje daugelį genų daro bendrojo stresinio atsako reguliacijos objektais. Jų tarpe yra anglies metabolizmo, transporterių, proteazių genai ir apsauginiai genai įvairių stresų atvejais – *HSP104*, *CTT1*, trehalozės metabolizmo genai *TPS1-3* ir *TSL1*. Dvigubi *msn2msn4* mutantai yra jautresni įvairiems stresams, pavyzdžiui, anglies badui, šiluminiam šokui, osmotiniam ir oksidaciniam stresams.

Padidinta *MSN2* ir *MSN4* genų raiška atstato atsparumą badui ir šiluminiam šokui. Bendrojo stresinio atsako reguliuojamų genų skaičius pakankamai didelis, bet *msn2msn4* mutantų fenotipiniai sutrikimai nėra tokie stiprūs, kokių galima būtų tikėtis. Kita vertus, genų promotoriuose yra ir kitų, papildomų reguliacinių sekų, tuo galima būtų paaiškinti minėtų mutantų fenotipinę raišką.

Stacionarioje augimo fazėje esančių mutantų ląstelės nepasižymi daugybiniu jautrumu, nežiūrint to, kad daugelio baltymų indukuojamų diauksinio perėjimo metu raiška priklauso nuo *Msn2/4p*. Šis faktas nurodo nuo *Msn2/4p* nepriklausomų gynybinių mechanizmų egzistavimą stacionarios augimo fazės ląstelėse. Šiuos mechanizmus aktyvuoja proteinkinazė *Rim15p* (pav. 2).

*Rim15p* kinazė dalyvauja fiziologinėse adaptacijose, kurios yra būtinos perėjimui į stacionarią augimo fazę. *rim15* mutantų ląstelės po perėjimo į stacionarą yra jautrios termišokui ir badui, negali indukuoti šaperonų *HSP12*, *HSP26*, *SSA3* genų postdiauksinės transkripcijos. Parodyta, kad cAMP neigiamai reguliuoja (slopina) *Rim15p* kinazę (pav. 2). Manoma, kad ši kinazė kartu su PKA gali dalyvauti *Msn2/4p* reguliacijoje (Igal, Estruch, 2000).

PKA kinazė įtakoja ne tik STRE genų transkripcinius mechanizmus. PDS (angl. trumpinys – **p**ost **d**iauxic **s**hift) *cis*-elementas, identifikuotas *SSA3* gene, savo seka – T/AAGGGA – primena STRE elemento seką ir taipogi reguliuojamas Ras/PKA signaliniu keliu (2 pav.).

Abu elementai reguliuojami skirtingais būdais. PDS seka tik nežymiai sustiprina genų raišką šiluminio šoko metu, be to ši raiška nenukenčia dėl STRE transkripcijos faktorių mutacijų. PDS elemento veikla susijusi su „zinko pirštu“ motyvą turinčiu transkripcijos faktoriumi *Gis1p*, kuri kontroliuoja *Rim15p* kinazę (2 pav.). *Gis1p* aktyvuoja PDS genus bado atsako metu. (Igal, Estruch, 2000).

*Rim15p* kinazė dalyvauja mejozės genų raiškos reguliacijoje, įtakoja glikogeno ir trehalozės kaupimą bei STRE-kontroliuojamų genų raišką, atsparumą karščio šokui, bei ląstelės ciklo sustabdymą G1 fazėje. *RIM15* geno delecija supresuoja PKA inaktyvacijos letalumą stacionarioje augimo fazėje. Nustatyta, kad PKA inhibuoja *Rim15p* kinazę *in vitro* fosforilindama. Tai parodo, kad *Rim15p* inaktyvavimas nuslopina augimą inhibuojančių genų raišką (2 pav.) (Thevelein, de Winde, 1999).

### **2.1.2.2. Atsarginių angliavandenių trehalozės ir glikogeno kaupimo reguliacija**

*Saccharomyces cerevisiae* mieles kaupia dviejų tipų atsarginius angliavandenius: gliukogeną ir trehalozę. Glikogenas yra didelės molekulinės masės šakotas polisacharidas,

sudarytas iš linijinių  $\alpha$ -(1,4)-gliukozidų, sujungtų  $\alpha$ -(1,6)- glikozididinėmis jungtimis. Trehalozė yra disacharidas, sudarytas iš dviejų gliukozės molekulių, sujungtų  $\alpha$ -(1,1)-glikozidine jungtimi.

Atsarginių angliavandenių – trehalozės ir glikogeno – kaupimas yra vienas iš pagrindinių veiksmų nulemiančių ankstyvą mielių metabolinį atsaką į įvairius aplinkos stresus (šiluminis šokas, aukštos druskų ir etanolio koncentracijos terpėje). Tai viena iš adaptacijų prie besikeičiančios aplinkos sąlygų, tai pat anglies ir energijos šaltinis blogėjant mitybinėms sąlygoms. (Francois, Parrou, 2001).

Pagrindinis glikogeno sintezės fermentas yra glikogensintazė (koduoja *GSY1* ir *GSY2* genai), o skaldymo – glikogenfosforilazė (koduoja *GPH1*). Glikogenas ląstelėje pradamas kaupti dar prieš diaksijos fazę, kol terpėje yra gliukozės, ir panaudojamas stacionario fazėje, kai trūksta mitybinių medžiagų. Glikogeno sintezės pradžioje aktyvinama glikogeno sintezės genų transkripcija, defosforiliniu inaktyvuojama glikogenfosforilazė.

Trehalozės sintezė ir skaldymas prasideda vėliau, kuomet vyksta antrinis kultūros augimas įsisavinant etanolį. Pagrindiniai trehalozės metabolizmo fermentai: sintezės fermentinis kompleksas, sudarytas iš keturių subvienetų, koduojamų *TPS1*, *TPS2*, *TSL1* ir *TPS3* genuose, bei skaldymo fermentai – Nth1p, Nth2p, Ath1p trehalazės, kurių pH optimumai yra skirtingi. Parodyta, kad PKA yra vienintelė proteinkinazė, kuri fosforilina Nth1p trehalazę aktyvuodama šį fermentą. Priešingai nei glikogensintazė, trehalozės sintezės fermentinis kompleksas nėra reguliuojamas grįžtamu fosforiliniu. Trehalozės sintezės/skaldymo santykis reguliuojamas substrato koncentracijos pokyčiais bei temperatūra. Šio fermentinio komplekso temperatūrinis optimumas yra 42-45°C, kai tuo tarpu mielių kultūros augimo optimali temperatūra yra tik 30 °C. Trehalozė pasižymi apsauginėmis savybėmis: apsaugo membranas nuo išdžiuvimo, o baltymus nuo denatūracijos ir agregacijos stresinėmis sąlygomis (pašalina vandenį nuo jų paviršiaus) (Francois, Parrou, 2001).

Genetinis ir metabolinis atsakas į stresą ląstelėje prasideda labai greitai. Kai eksponentinėje augimo fazėje esančios ląstelės patiria aukštos temperatūros, natrio chlorido, aukštų etanolio koncentracijų stresą, jose greitai padidėja glikogeno ir trehalozės gamyba. Faktiškai, transkripcijos lygmenyje glikogeno ir trehalozės sintezės genų reguliavimas vyksta per STRE elementų kontrolę Msn2/4p transkripcijos faktoriais. Tačiau be šios reguliacijos ląstelėje kinta fermentų kiekis ir aktyvumas, keičiasi substratų kiekis, todėl atsarginių angliavandenių metabolizmą užtikrina genų transkripcijos ir fermentinių sistemų valdymo mechanizmų sąveika (Francois, Parrou, 2001).

Kol ląstelei pakanka maisto medžiagų PKA aktyvumas stabdo glikogeno ir trehalozės kaupimą genetiniame ir fermentiniame lygmenyje. Kada maisto medžiagos išnaudojamos, sumažėja Ras/PKA kelio aktyvumas ir nebevyksta genų ekspresija. To pasekoje labai smarkiai

išauga glikogeno kiekis. Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas neigiamai veikia glikogeno sintezės genų raišką, neleisdamas Msn2/4p transkripcijos faktoriams patekti į branduolį. Be to, dar vyksta ir nuo Msn2/4p nepriklausoma, kol kas neapibūdinta Ras/PKA kelio kontrolė (Francois, Parrou, 2001).

### **2.1.2.3. Ras/PKA kelio įtaka augimui ir ląstelės proliferacijai**

Ciklinas Cln3 yra svarbi jungtis tarp mitybinių išteklių jutimo ir Cdc28p kinazės aktyvumo. Tačiau neaišku koku būtent būdu mitybinių išteklių kontroliuojami signaliniai keliai įtakoja Cln3. Ląstelės, kuriose Ras/PKA signalinis kelias yra inaktyvuotas sustabdo ląstelės ciklą STARTO taške ir nesintetina ciklinų nepaisant to, kad terpėje yra pakankamai mitybinių medžiagų. Tikėtina, kad mitybos šaltinis ir cAMP kompleksiskai įtakoja ciklinų sintezę. Ciklinų sintezės aktyvavimas nėra vien cAMP signalo poveikis (Thevelein, de Winde, 1999).

Ras/PKA signalinis kelias tai pat neigiamai įtakoja diploidinių ląstelių sugebėjimą sporuliuoti ir stimuliuoja pseudohifinį augimą. Diploidinių ląstelių perėjimą į pseudohifinį augimą skatina *RAS2<sup>val19</sup>* alelio raiška. Trys PKA katalitiniai Tpk subvienetai specifiskai veikia pseudohifinio augimo indukciją (Robertson, Fink, 1998; Thevelein, de Winde, 1999).

Pagrindinio mejozės reguliatoriaus *IME1* geno raiška yra slopinama gliukozės ir tuo pačiu PKA aktyvumo tarpininkaujant Msn2/4p transkripcijos faktoriams. Tikėtina, kad PKA ir mitybiniais ištekliais valdomos sporuliacijos kontrolėje, dalyvauja tie patys faktoriai, kaip ir vegetatyvinių ląstelių mitybinėmis medžiagomis reguliuojamos proliferacijos atveju (Thevelein, de Winde, 1999).

### **2.1.3. Kai kurių Ras/PKA signalinio kelio dalyvių mutacijų sąlygojami fenotipai.**

Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas mielėse *S. cerevisiae* įtakoja labai daug gyvybiškai svarbių funkcijų, todėl yra labai griežtai kontroliuojamas. Mutacijos, kurių pasekoje pakinta signalinio kelio aktyvumas, sąlygoja smarkius metabolizmo pokyčius, pasižymi pleotropiniu poveikiu.

#### **Padidėjusio Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo požymiai:**

- ✚ Jautrumas temperatūriniam šokui;
- ✚ Jautrumas badui ir bendrai stresui;
- ✚ Ląstelė sukaupia mažai atsarginių angliavandenių - trehalozės ir glikogeno;
- ✚ Sutrinka ląstelės ciklo sustabdymas G1 fazėje kai terpėje sumažėja mitybių išteklių kiekiai;



- ✚ Labai prastas augimas terpėje su nefermentuojamais (glicerolis, etanolis, acetatas) ir sunkiai fermentuojamais (galaktozė) anglies šaltiniais;
- ✚ Sutrinka diploidinių ląstelių sporuliacija.

#### **Sumažinto Ras/PKA kelio aktyvumo požymiai:**

- ✚ Padidėjęs atsparumas stresui;
- ✚ Padidėję kaupiamų trehalozės ir glikogeno kiekiai;
- ✚ Pastovi temperatūrinio šoko ir kitų paprastai tik stacionarioje augimo fazėje ekspresuojamų genų raiška;
- ✚ Diploidinių ląstelių sporuliacija turtingoje terpėje.

Pernelyg žemas Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas yra letalus, kadangi ląstelė negali pereiti STARTO taško G1 stadijoje ir dalinimosi ciklas sustabdomas, lieka Go fazėje (Thevelein, 1994).

Stacionarios fazės *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės yra atsparesnės karščio šokui nei aktyviai augančios ląstelės. Kai ląstelė patiria karščio šoką, jos ciklas laikinai sustoja G1 fazėje. *cyr1* mutacijų fenotipas (sumažėjęs adenilatciklazės aktyvumas) pasireiškia žema cAMP koncentracija, ląstelės ciklo sustabdymu G1 fazėje, bei konstitutyvia šaperonų raiška, kas užtikrina geresnį atsparumą karščio šokui nei laukinio tipo adenilatciklazės atveju. cAMP pridėjimas į terpę atstato fenotipą (Shin ir kt., 1987). Adenilatciklazės geno delecija yra letali, nes Ras/PKA kelio aktyvumas šiuo atveju yra nepakankamas ląstelių gyvybingumui palaikyti.

Parodyta, kad *cyr1* mutacinį fenotipą iš dalies supresuoja PKA reguliacinį subvienetą koduojančio geno *bcy1* (*loss-of-function*) mutacija: cAMP koncentracija ląstelėje lieka maža, tačiau nuo cAMP nepriklausomo fosforilinimo dėka (katalitiniai PKA subvienetai nebeinhibuojami) ląstelės ciklas nesustoja G1 fazėje azoto bado sąlygomis (Shin ir kt., 1987).

Fermentacijos iniciacija mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse susijusi su greitu atsparumo stresui mažėjimu. *CYR1* geno mutacijos sąlygojančios gliukoze indukuoto adenilatciklazės aktyvumo mažėjimą (po signalo nėra vadinamojo cAMP piko) pasireiškia atsparumo karščio šokui mažėjimu, trehalazės aktyvumo padidėjimu. Yra izoliuoti mutantiniai laboratoriniai mielių kamieniai, kuriuose atsparumas stresui prasidėjus fermentacijai nemažėja. Jų adenilatciklazės *CYR1* gene aptikta specifinė mutacija tarp Ras baltymus surišančio ir katalitinio domenų (1682 padėtyje gliutamatas pakeistas lizinu) ir pavadinta *fill* (angl. trumpinys **f**ermentation-**i**nduced **l**oss of stress resistance). Šios recesyvinės mutacijos atveju fermento aktyvumas 10 kartų mažesnis už normą. Įdomu tai, kad fermentacijos aktyvumas *fill* mutantų ląstelėse nesumažėja, kaip kad vyksta kitų sumažinto adenilatciklazės aktyvumo mutantų ląstelėse. Paprastai adenilatciklazės aktyvumo sumažėjimas, kaip ir PKA atveju, pasireiškia ląstelių augimo greičio mažėjimu, išėsta laike lag faze ir sumažintu fermentacijos aktyvumu.

Derepresuotų *fill* mutantų kultūros ląstelių gyvybingumas po termošoko 10 kartų viršija laukinio tipo ląstelių gyvybingumą. Pridėjus gliukozės į derepresuotų ląstelių terpę (indukuojamas cAMP signalas) stebimas net 100-kartinis gyvybingumo skirtumas. Nežiūrint to, kad gliukozės-indukuotas trehalozės skaldymas *fill* mutantų ląstelėse yra greitas, trehalozės jose lieka daugiau nei laukinio tipo kamienų ląstelėse. Pastebėta, kad *fill* mutantų ląstelėse trehalozės sintazės genų raiška yra 10 kartų padidėjusi, tuo tarpu *HSP104*, *HSP26* ir *SSA3* (atsparumą termošokui lemiančių šaperonų) genų raiškos slopinimas gliukoze tik nežymiai silpnėjęs nei laukinio tipo kamienų ląstelėse.

*fill* alelio adenilatciklazės aktyvumo analizė parodė, kad fermento stimuliavimas G baltymais nėra pažeistas, tačiau vidinis adenilatciklazės aktyvumas yra sumažėjęs. Tokiu būdu specifiniai *fill* mutantų fenotipai sąlygojami ne sutrikusios adenilatciklazės-aktyvatorių sąveikos, o greičiau paties fermento sumažinto maksimalaus aktyvumo (Dijck ir kt., 2000).

Adenilatciklazės katalitinio domeno mutacijos sąlygoja tipiskų sumažinto Ras/PKA kelio aktyvumo požymius. Adenilatciklazė nebereaguoja pakankamu cAMP sintezės suintensyvėjimu nei gliukozės, nei viduląstelinio rūgštėjimo aktyvinama. Sumažėja gliukozės sąlygota trehalazės indukcija, susilpnėja trehalozės ir glikogeno skaldymas, sumažėja ląstelės atsparumas stresui. Kadangi adenilatciklazė nebereaguoja pakankamai stipria cAMP sinteze į viduląstelinį parūgštėjimą, ląstelė tampa atsparesnė žemam terpės pH, pagerėja silpnų rūgščių (pavyzdžiui, acto rūgšties) inhibuojamas augimas. Tokio tipo mutacijos taipogi iš dalies supresuoja *RAS2<sup>val19</sup>* konstitutyviai aktyvaus *RAS2* alelio fenotipą (Vanhalewyn ir kt., 1999).

Vertinant *RAS* mutacijų fenotipus svarbu prisiminti, jog Ras baltymų vaidmuo ląstelėje neapsiriboja vien adenilatciklazės stimuliavimu, jie taipogi reikalingi bazinio cAMP sintezės lygio palaikymui (Thevelein, 1992). Adenilatciklazė privalo pastoviai sintetinti tam tikrą cAMP kiekį, kad užtikrintų tinkamą sintezės ir fosfodiesterazių hidrolizės aktyvumų balansą, kurio rezultatas yra pastovus (įprastomis sąlygomis) bazinis cAMP kiekis ląstelėje. Vieno iš *RAS* genų delecija nepaveikia mielių ląstelių gyvybingumo, bet dviejų iškart yra letali, kadangi cAMP sintezės intensyvumas nėra pakankamas ląstelių gyvybingumui palaikyti. *RAS2* delecija ir *RAS2<sup>val19</sup>* alelio raiška fenotipiškai pasireiškia kaip cAMP metabolizmo sutrikimai.

*RAS2* geno delecija sąlygoja atsarginių angliavandenių (glikogeno ir trehalozės) kaupimą ir diploidinių mielių ląstelių sporuliaciją turtingoje terpėje. Toks fenotipas stebimas ir sumažinto cAMP lygio arba žemo PKA aktyvumo mielių mutantų kamienuose. *RAS2* geno delecija taip pat pasireiškia nesugebėjimu augti ir įsisavinti nefermentuojamą anglies šaltinį minimalioje terpėje (Thevelein, 1992).

Yra sukonstruoti keli žinduolių *ras* onkogeninių alelių analogai mielėse. Geriausiai ištirtas *RAS2<sup>val19</sup>* dominantinis alelis, kurio produktas pasižymi smarkiai sumažėjusiu GTPaziniu

aktyvumu ir yra nejautrus Ira baltymų poveikiui (konstatyviai aktyvus *RAS2* alelis). Ši alelių ekspresuojantys mielių kamienai, kaip ir kamienai su *IRA* genų delecija demonstruoja panašius Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo fenotipus. *RAS2<sup>val19</sup>* ir panašią *RAS1* analogų raiška mielių *S. cerevisiae* ląstelėse sąlygoja labai žemą glikogeno ir trehalozės kaupimo lygį, jautrumą šiluminiam šokui ir azotiniam badui, o taip pat labai silpną diploidinių ląstelių gebėjimą sporuliuoti. (Thevelein, 1992; Thevelein, 1994).

Mielių proteinkinazė A dalyvauja daugybės gyvybiškai svarbių ląstelės procesų, tokių kaip augimas, atsarginių angliavandenių kaupimas, atsparumas stresui, diferenciacija, reguliacijoje. Sumažinto PKA aktyvumo fenotipas pasireškia ląstelių ciklo sustabdymu G1 fazėje, sustiprėjusiu trehalozės ir glikogeno kaupimu, padidėjusiu ląstelės atsparumu šiluminiam šokui ir oksidaciniam stresui. Panašų fenotipą demonstruoja laukinio tipo ląstelės kai jų aplinkoje trūksta maisto medžiagų. Padidinto PKA aktyvumo atveju *STRE*-priklausomų ir glikogeno sintezės genų transkripcija stipriai inhibuojama, ląstelė sukaupia mažai atsarginių angliavandenių ir yra labai jautri įvairioms streso formoms (Smith ir kt., 1998).

Iš visų žinomų Ras/PKA kelio mutacijų, *BCY1* geno delecija sąlygoja stipriausius kelio taikinių reguliacijos sutrikimus dėl konstatyvaus katalitinių subvienetų aktyvumo. Rezultate stebimas maksimaliai padidinto Ras/PKA kelio aktyvumo fenotipas (Thevelein, de Winde, 1999). *BCY1* geno padidinta raiška sumažina PKA holofermento aktyvumą ir cAMP priklausomą proteinkinazės aktyvavimą. Taip pat pastebėta, kad akumuliuojamas cAMP lygis tokiuose kamienuose yra padidėjęs – reguliacinių subvienetų perteklius nutitruoja cAMP nukleotidus ir padaro juos neprieinamus fosfodiesterazei. Laukinio tipo PKA holofermentas nesant pakankamai cAMP koncentracijai negali užtikrinti minimalaus aktyvumo ląstelės gyvybingumui palaikyti, tuo tarpu kai kurios mutantinės PKA formos demonstruoja įvairaus intensyvumo konstatyvių cAMP nepriklausomą aktyvumą. Tikėtina, taip atsitinka dėl baltymo tretinės struktūros pasikeitimo kai „imituojama“ sąveika su cAMP ir pasikeičia reguliacinių subvienetų afiniškumas katalitiniams subvienetams. Pastebėta, kad PKA gali būti aktyvi ir nedisocijuotoje formoje, tik tas aktyvumas nedidelis (Portella ir kt., 2001).

Trys PKA katalitiniai subvienetai pasižymi dideliu tarpusavio panašumu. Visų trijų subvienetų (*TPK1*, *TPK2*, *TPK3*) genų delecija yra letali (nulinis PKA aktyvumas), tačiau jei yra aktyvus bent vienas iš trijų genų, to pakanka ląstelei išgyventi. Azoto bado sąlygomis indukuojamo pseudohifinio augimo atveju pastebėta, kad Tk2p yra esminis induktorius augimo pobūdžio pasikeitimui, Tpk3p inhibuoja, o Tpk1p išvis neįtakoja šio proceso. Taigi PKA katalitiniai subvienetai nėra lygiaverčiai metabolinių procesų reguliacijoje. (Robertson, Fink, 1998).

## **2.2. Epigenetiniai elementai ir jų įtaka**

### ***Saccharomyces cerevisiae* ląstelės funkcijų reguliacijai.**

Ląstelę supa besikeičianti erdvė ir laike aplinka, prie kurios jai nuolatos tenka prisitaikyti, adaptuotis. Mielių *S. cerevisiae* ląstelė taiko universaliausią gyvojo pasaulio išgyvenimo strategiją – reguliuoja metabolizmo procesus atitinkamai keisdama genų veiklą. Be to egzistuojantys mielių ląstelėje epigenetiniai elementai – prionai – suteikia papildomo adaptacinio plastiškumo, kadangi leidžia papildomai reguliuoti gyvybinius procesus moduluojant baltymų funkcijas esant tam pačiam genotipui. Manoma, tai padidina populiacijos bioįvairovę ir sudaro palankesnes sąlygas adaptuojantis (Chernoff, 2001). Ląstelės genetinis fonas irgi gali įtakoti baltymų prionizaciją ir plitimą (Bouset, Melki, 2002; Chernoff, 2001; Uptain, Lindquist, 2002).

#### **2.2.1. Mielių prionų savybės. Mielių priono koncepcija.**

Prionai iš pradžių buvo pradėti nagrinėti kaip baltyminiai infekciniai agentai, sukeltantys žmonių ir gyvūnų transmisines spongiformines encefalopatijas (žmonėms – kuru, Creutzfeld-Jacob sindromas, fatalinė šeimininė insomnija; avims – scrapie; galvijams – BSE, taip pat įvairios encefalopatijos vištų, kačių, elnių atvejais). Šios ligos gali plisti infekcijos būdu, o taip pat spontaniškai atsirasti. Visiems išvardintiems susirgimams būdingas ilgas inkubacinis periodas, neuronų irimas ir amiloidinės sankaupos smegenų audinyje. Amiloidinės sankaupos yra ne kas kita, kaip žinduolių PrP<sup>C</sup> baltymo prionizuota forma (PrP<sup>Sc</sup>), kuriai būdingas natyvos baltymo struktūros (daugiausia  $\alpha$  spiralės) pakeitimas  $\beta$  klostėmis ir labai tvarkingas agregavimasis į fibriles. Tai yra visų prionizuotų linkusių baltymų požymis. Susidariusios struktūros gali infekuoti sveiką organizmą, normalius ląstelės baltymus (prioninio baltymo ląstelinius analogus) autokatalizės būdu paversdamos prionizuotais (Caughey, 2001). Tokiomis savo savybėmis PrP<sup>Sc</sup> labai panašus į kitų neurodegeneratyvinių ligų baltymus (Alzheimerio, Hantingtono ligos). PrP<sup>Sc</sup> taip pat būdingas žemas tirpumas detergentuose, aukštas atsparumas proteazėms (pvz., proteazei K) (Ter-Avanesian, Kushnirov, 1999).

Prieš kurį laiką baltyminiai ne chromosomose paveldimi determinantai buvo atrasti ir mielėse – [*PSI*<sup>+</sup>] ir [*URE3*]. Skirtingai nei kitus autonominius citoplazminius determinantus, tokius kaip virusai ar plazmidės, nei [*PSI*<sup>+</sup>], nei [*URE3*] nepavyko susieti su jokia nukleorūgštimi. Keliom savo esminėm savybėm šie determinantai pasirodė turį panašumų su žinduolių prionais: baltymine prigimtimi, sugebėjimu perduoti savo savybes normaliai ląstelinei baltymo formai, sugebėjimu spontaniškai atsirasti iš normalios baltymo formos, o taip pat atsparumu įvairiems,

šiai jau kenksmingiems normaliai natyviai baltymo formai agentams - proteazėms, detergentams, UV ir jonizuojančiai spinduliuotei.

Egzistuoja „stiprūs“ ir „silpnai“ prionų variantai. Jie gali koegzistuoti vienoje ląstelėje. Paminėti prionų variantai skiriasi tarpusavyje konformacinėmis savybėmis, atsparumu „gydantiems“ agentams, tikėtina, kad ir plitimo greičiu (Ter-Avanesian, Kushnirov, 1999; Kushnirov ir kt., 2000).

Šiuo metu mielių *S. cerevisiae* prionai yra kur kas geriau išnagrinėti negu žinduolių. Daugiausia duomenų sukaupta apie mielių *S. cerevisiae* [*PSI*<sup>+</sup>] ir [*URE3*] prionus bei filamentinio grybo *Podospora anserina* [*Het-s*] prioną. Tiriami prionai [*PIN*<sup>+</sup>], [*Tau*], [*ISP*<sup>+</sup>], [*GR*], [*NU*<sup>+</sup>] (Uptain, Lindquist, 2002). Kompiuterinės analizės būdu nustatyta, kad tarp ~6000 *S. cerevisiae* genų, koduojančių baltymus, 107 yra potencialūs prionus koduojantys kandidatai (Michelisch, Weissman, 2000). Mielių prioniniai baltymai nėra homologiški nei tarpusavyje, nei žinduolių PrP baltymui. Ląstelėje jie atlieka skirtingas funkcijas. Koduojami branduolio genų, prionais virtę baltymai yra metastabilūs, t. y. normalioje mielių ląstelėje spontaniškai atsiranda nedideliu dažniu ( $10^{-7} - 10^{-5}$ ) ir retais atvejais gali būti spontaniškai prarandami (Uptain, Lindquist, 2002).

Iš pradžių [*PSI*<sup>+</sup>] ir [*URE3*] citoplazminiai determinantai buvo aprašyti genetiškai, tačiau 1994 metais R. Wickner iškėlė hipotezę, kurios esmė būtų tokia: minėti citoplazminiai determinantai yra ne kas kita, kaip prionai. Tuo pačiu Wickner pasiūlė bendrąją priono koncepciją, kuri teigia, kad prionas yra pakitusios konformacijos (pakinta antrinė ir tretinė struktūra) baltymas, netekęs savo normalios funkcijos, ir galintis indukuoti normalaus baltymo prionizaciją. Remiantis šia koncepcija prionas turėtų atitikti sekančius kriterijus:

**1. Paveldėjimas ne Mendelinio būdu.** Prionas yra infekcinis baltymas, ir, kaip visi mielių infekciniai elementai, patenka iš ląstelės į ląstelę tik joms kryžminantis ir paklūsta ne Mendelinio paveldėjimo dėsniams.

**2. Grižtamas išgydymas.** Veikiant prionizuotą mielių kamieną įvairiais cheminiais, aplinkos ir baltyminių (keičiant šaperonų ekspresijos lygį) agentais įmanoma pašalinti prioną iš populiacijos, tačiau vis vien lieka nedidelė (maždaug  $10^{-6}$ ) tikimybė įvykti prionizacijos reindukcijai: po kurio laiko populiacijoje vėl atsiranda prionizuotų ląstelių. Tuo tarpu prarasti DNR ar RNR citoplazminiai determinantai savaime vėl nebeatiranda.

**3. Priono indukcija esant padidintam baltymo kiekiui.** Esant padidintai baltymo produkcijai ląstelėje padaugėja molekulių-taikinių skaičius, priono agregatai lengviau susidaro ir plinta, tokiu būdu išauga prionizacijos tikimybė. Taip nutinka dėl kelių įmanomų priežasčių:

✚ Dėl padidėjusios baltymo koncentracijos padaugėja baltymo molekulių-taikinių skaičius ir neužtenka šaperonų deramai suklostyti visas perprodukuoto

baltymo molekules. Susidaro neteisingai suklostyta baltymo forma ir tai padidina prionizacijos tikimybę.

✚ Jeigu šaperonas nespėja teisingai suklostyti baltymą, tai proteazės jį greitai sukarpo, palikdamos sutrumpėjusius domenų, kurių dalis gali lengviau prionizuotis.

**4. Fenotipinis ryšys tarp priono ir jo geno mutacijos.** Įvykus recesyvinei chromosominei mutacijai stebimas fenotipas yra toks pat, kaip ir įvykus prionizacijai – visiškas funkcijos praradimas (angl.: *loss of function*). Pirmuoju atveju visai nevyksta baltymo produkcija arba jis sintetinamas neaktyvus, antruoju – normalaus baltymo prionizacija sąlygoja funkcijos praradimą (Wickner, 1994; Wickner ir kt., 1999).

Kalbant apie prionus šiandien, yra akivaizdu, kad prioninių baltymų buvimas yra būtina, tačiau vis dėl to nepakankama sąlyga prionizacijos procesui vykti. Didelę įtaką turi kiti baltymai (pvz., šaperonai), pagaliau ląstelės genetinis fonas.

### **2.2.2. Fenotipinė mielių prionų išraiška**

#### **Mielių prionas [ $PSI^+$ ] ir jo fenotipinė išraiška**

[ $PSI^+$ ] prionas mielių ląstelėje atlieka kaip ir baltymų biosintezės tikslumo epigenetinio modulatoriaus funkciją (Cox, 1965). Citoplazminį determinantą [ $PSI^+$ ] koduoja *SUP35* genas. Šio geno produktas Sup35p baltymas ląstelėje yra atsakingas už transliacijos terminaciją. [ $PSI^+$ ] yra ne kas kita, kaip mielių transliacijos terminacijos faktoriaus Sup35p prionizuota, neaktyvi forma.

Sup35 polipeptide galima išskirti 3 regionus: N galinis regionas (1-123 am. r.); M vidurinis regionas (124-253 am. r.); C galinis regionas (254-685 am. r.). Didelis asparagino ir gliutamino amino rūgščių kiekis ir oligopeptidiniai pasikartojimai nulemia, kad baltymo Sup35 N galinis domenai veikia kaip PrD – prionizacijos domenai (angl. trumpinys: ***prion domain***), tai yra skatina priono [ $PSI^+$ ] atsiradimą ląstelėje (Uptain, Lindquist, 2002; De Pace ir kt., 1998; Michelitsh, Weissman, 2000). Viduriniame M regione 41% amino rūgščių sudaro lizinas, gliutaminas ir asparaginas. Šio regiono sekos taip pat nėra konservatyvios. M domenai neįtakoja priono indukcijos, tačiau moduluoja nuo šaperonų priklausomo priono plitimo efektyvumą (Liu ir kt., 2002). Sup35p C galinis regionas yra katalitinis baltymo domenai. Jis turi 4 GTP surišimo saitų amino rūgščių motyvus bei numanomą PKA fosforilinimo vietą ir yra homologiškas aukštesniųjų eukariotų transliacijos elongacijos faktoriui EF-1 $\alpha$  (Kikuchi ir kt., 1988).

Transliacijos terminacijos genetinių ir epigenetinių reguliatorių pokyčiai gali stipriai sumažinti šio proceso tikslumą. Laboratorinėmis sąlygomis tokie pokyčiai ir jų pasekmės tiriama mielių kamienuose, turinčiuose nonsens mutacijas. Paprastai genų nonsens mutacijos trukdo

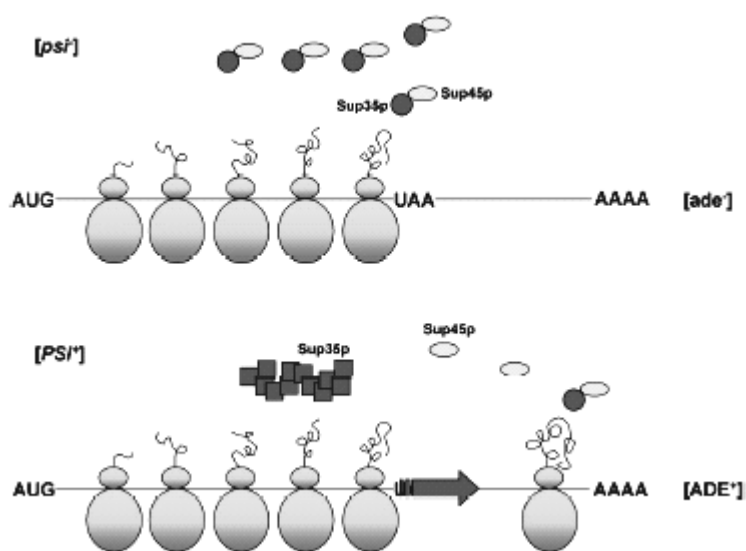
baltymų ekspresijai. Sutrikus transliacijos terminacijos faktorių funkcijai arba pasikeitus jų koncentracijai, ribosoma gali nuskaityti nonsens kodoną, kaip koduojantį kokią nors amino rūgštį, priklausomai nuo esančių ląstelėje tRNR nonsens supresorių specifiškumo. Tokiu atveju yra didelė tikimybė, kad normalus ląstelės fenotipas atsistatys (Serio, Lindquist, 1999).

Nonsens supresijos reiškinys yra paplitęs gamtoje, kartais tai yra ne patologija, o dėsningas kai kurių virusinių, ir ląstelinių genų ekspresijos kontroliavimo pavyzdys. Stop kodonų įprasminimui tokiais atvejais reikia įvairių *cis*-signalų, pavyzdžiui: mRNR segtukų susidarymo, tam tikro 3' stop kodono konteksto (Skuzheski ir kt., 1991). Mielėse toks efektas gali pasireikšti sumažinus transliacijos terminacijos faktorių koncentraciją ląstelėje (Stansfield ir kt., 1996), arba įvykus Sup35p (eRF3) prionizacijai (Wickner, 1994).

[*PSI*<sup>+</sup>] fenotipiškai aptinkamas dėl silpno serinui specifinio nonsens supresoriaus *SUQ5* sustiprėjusio poveikio. *SUQ5* genas koduoja serinui specifinę tRNR, kurios antikodono kilpa komplementari *ochre* nonsens kodonui UAA. Kai ląstelėje nėra [*PSI*<sup>+</sup>] priono, Sup35p yra aktyvus ir *SUQ5* nonsens supresorius nesugeba pakankamai stipriai supresuoti *ade2-1* nonsens mutaciją, dėl ko ląstelės augančios terpėje be adenino įgauna raudoną spalvą (3 pav.) (Ter-Avanesian, Kushnirov, 1999).

Šiuo metu žinomi keli nonsens supresorių tipai. Tai gali būti mutacijos tRNR antikodono kilpoje, dėl kurių įvyksta *ochre* (UAA), *amber* (UAG) ar *opal* (UGA) stop kodonų atpažinimas ir sustiprėja nonsens supresija (Sherman ir kt., 1979). Įmanomos ribosominių baltymų, transliacijos terminacijos faktorių *SUP35* ir *SUP45* mutacijos. Šiuo atveju supresuojami visi trys nonsens kodonai (angl. *omnipotent suppressors*).

[*PSI*<sup>+</sup>] faktoriaus epigenetinės transliacijos terminacijos moduliacijos reiškinį Cox aprašė jau 1965 metais. Kitaip nei genetiniai modulatoriai, kurie sustiprina (allosupresoriai) arba susilpnina (antisupresoriai) nonsens supresijos efektyvumą, veikdami tRNR ar omnipotentinius supresorius, [*PSI*<sup>+</sup>] prionas gali



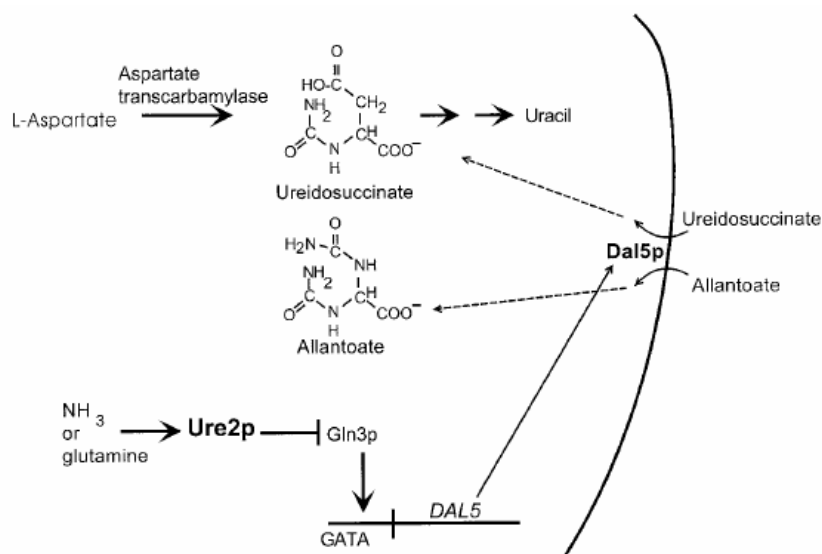
**3 pav. [*PSI*<sup>+</sup>] priono fenotipinė išraiška *ade2-1* alelio nonsens mutantuose.** [*psi*<sup>-</sup>] ląstelėse, neturinčiose priono, transliacijos terminacija vyksta normaliai ir todėl adenino sintezė ląstelėse nevyksta: [*ade*<sup>-</sup>] fenotipo kolonijos yra raudonos. [*PSI*<sup>+</sup>] ląstelėse transliacijos terminacijos efektyvumas sumažėjęs, todėl dalinės stop kodono supresijos pakanka, kad būtų atstajta *ADE2* geno funkcija. [*ADE*<sup>+</sup>] fenotipo kolonijos yra baltos. (Fernandez-Bellot, Cullin, 2001).

sustiprinti abiejų paminėtų supresorių tipų poveikį ir pats gali tapti supresijos priežastimi net kai nėra žinomų genetinių supresorių poveikio, nes dėl prionizacijos sumažėja funkcionalaus Sup35 baltymo kiekis ir pagerėja sąlygos supresorinėms tRNR konkuruoti su translacijos terminacijos faktoriumi dėl nonsens kodonų. Taigi,  $[PSI^+]$  prionui būdingas omnipotentinės supresijos fenotipas (Cox B., 1965; Serio, Lindquist, 2000).

### 2.2.3. $[URE3]$ priono fenotipinė išraiška. Azoto katabolinė represija.

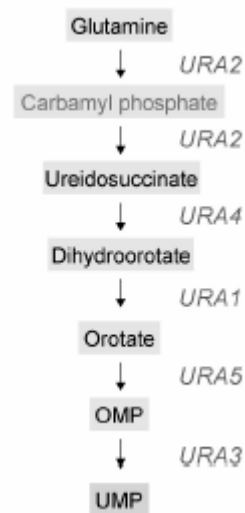
$[URE3]$  prionas yra neaktyvi, pakitusios konformacijos Ure2p baltymo forma, gebanti keisti natyvaus ląstelinio Ure2p baltymo konformaciją ir tokiu būdu yra stabiliai citoplazmiškai paveldima mielių kultūroje. Ure2p atlieka azoto katabolinės represijos regulatoriaus vaidmenį mielėse.

$[URE3]$  prioną 1971m atrado Francois Lacroute tyrinėdamas uracilo biosintezės kelią. Dvi pirmasias reakcijas vykdo *URA2* geno produktas, atliekantis dvi funkcijas – karbamilfosfat sintetazės ir aspartat transkarbamilazės. Jo dėka vyksta ureidosukcinato (USA) sintezė iš L-aspartato (4 ir 5 pav.) (Lacroute, 1971).



4 pav. Ure2p reguluoja azoto katabolinę represiją blokuodamas ureidosukcinato, tarpinio uracilo biosintezės produkto transportą į ląstelę. (Wickner ir kt., 1999)

Kai mielės auga terpėje su turtingu azoto šaltiniu (amonis arba gliutaminas) represuojama fermentų ir transporterių, reikalingų sunkiai įsisavinamų azoto šaltinių utilizavimui, transkripcija. Ure2p yra turtingų azoto šaltinių sensorius ir blokuoja transkripcijos aktyvatoriaus Gln3p aktyvumą. USA (ureidosukcinatas arba *N*-karbamil aspartatas) struktūriškai labai panašus į alantoatą. USA yra aspartat transkarbamilazės produktas. *ura2* ląstelės, kuriuose šis fermentas neaktyvus gali transportuoti USA į ląstelę augant terpėje su sunkiai įsisavinamu azoto šaltiniu.

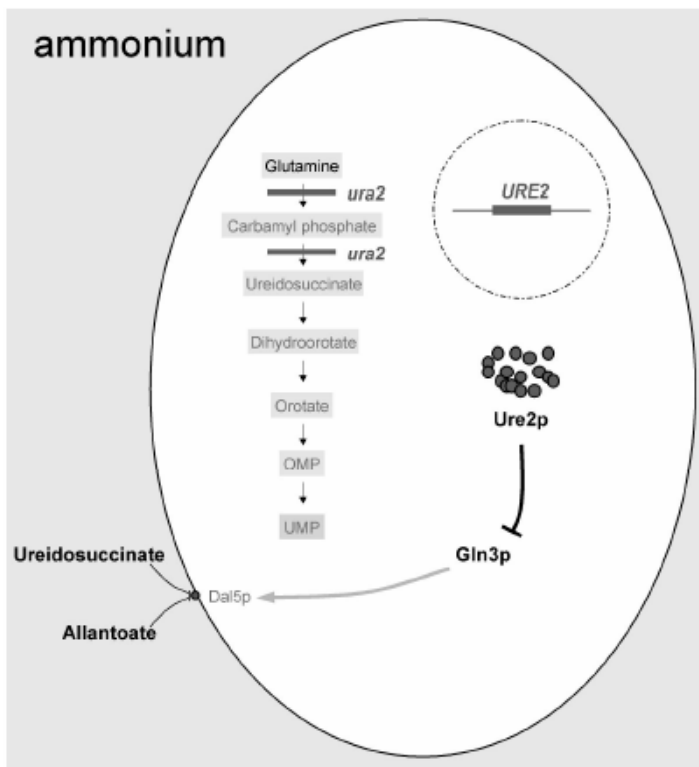


5 pav. Uracilo biosintezė mielėse. (Fernandez-Bellot ir Cullin, 2001)  
OMP – orotidin 5' monofosfatas,  
UMP – uridin 5' monofosfatas.

*ura2* mutantai nesugeba sintetinti USA. Ureidosukcinato transportą į ląstelę kontroliuoja alantoatpermeazė (*DAL5* geno produktas). *DAL5* aktyvumas reguliuojamas transkripcijos



lygmenyje azoto katabolinės represijos metu priklausomai nuo terpės sudėties (Lacroute, 1971; Wickner, 1994). Jeigu terpėje yra turtingas, lengvai įsisavinamas azoto šaltinis, pavyzdžiui, amonis, *DAL5* permeazė neekspresuojama. Kai terpėje yra tik sunkiai metabolizuojamas azoto šaltinis kaip, pavyzdžiui, protinas, *DAL5* genas transkribuodamas. To pasekoje alantoatas transportuojamas į ląstelę ir naudojamas kaip azoto šaltinis. Kadangi USA struktūriškai labai panašus į alantoatą, Dal5p permeazė gali ir jį transportuoti per membraną. Kai terpės sudėtyje yra amonis, *DAL5* genas yra represuojamas, *ura2* mutantai negali pasiimti USA iš aplinkos ir neauga (6 pav.).

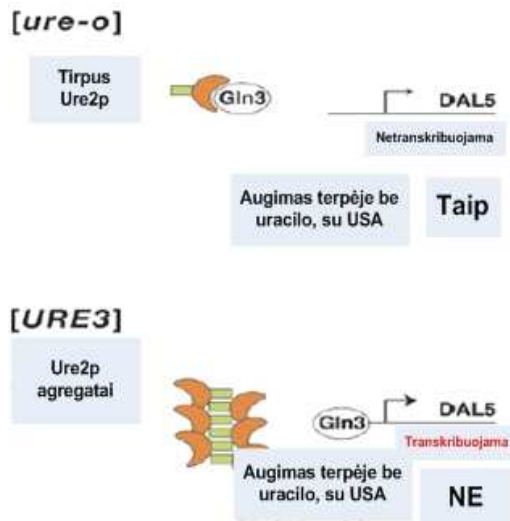


6 pav. Ure2p vaidmuo azoto katabolinėje represijoje (Fernandez-Bellot, Cullin, 2001).

Esant terpėje amoniui, Ure2p citoplazmoje blokuoja Gln3 transkripcijos faktorių, ko pasekoje nevyksta Dal5p alantoat permeazės ekspresija, netransportuojamas į ląstelę ureidosukcinatas ir *ura2* ląstelės negali sintetinti UMP.

OMP – orotidin 5' monofosfatas,

UMP – uridin 5' monofosfatas.



7 pav. Ure2p prionizacijos poveikis azoto katabolinei represijai (Chien ir kt., 2004).

Tarp *ura2* mielių mutantų Francois Lacroute aptiko *ure2* mutantus, kurie auga ant terpės su amoniu ir USA. Tačiau šių mutantų (*ura2ure2*) grupė pasirodė esanti heterogeniška pagal *ure2* paveldėjimo pobūdį kryžminant juos su *ura2URE2* kamieniu (turi laukinio tipo *URE2* geną) (Lacroute, 1971):

- ✚ Dalyje testuojamų *ure2* kamienų mutaciją buvo recesyvinė ir tarp segregantų buvo paveldima pagal klasikinius Mendelio dėsnius 2:2 santykiu, kas parodo normalią „*loss of function*“ chromosominio *URE2* geno mutaciją ( $Usa^+$  fenotipas).

- ✚ Kituose *ure2* mutantuose  $Ura^+$  fenotipas (7 pav.) buvo paveldimas kaip dominantinis požymis, ne pagal Mendelio dėsnius (4:0 santykiu). Dar daugiau, šis mutantinis fenotipas buvo stabiliai paveldimas po citodukcijos visuose palikuonyse. Remiantis išdėstytais kriterijais šis elementas buvo priskirtas prie nechromosominių genetiinių elementų, tokių kaip  $[PSI^+]$  (Cox, 1965). Naujas epigenetinis elementas buvo pavadintas  $[URE3]$ .

#### 2.2.4. $[PIN^+]$ faktorius. Mielių prionų tarpusavio sąveika

$[PSI^+]$  priono indukcijai svarbus yra  $[PIN^+]$  faktoriaus buvimas ląstelėje (Derkatch ir kt., 1997).  $[PIN^+]$  determinantas atitinka svarbiausius priono koncepcijos kriterijus – paveldėjimas ne Mendeliniu būdu ir grįžtamai išgydomas GndHCl (Derkatch ir kt., 2000). Žinoma, kad  $[PIN^+]$  tai tas pats  $[RNQ^+]$  prionas (Sondheimer, Lindquist, 2000). Rnq1p baltymas, kaip jau buvo minėta, neįtakoja ląstelės gyvybingumo, išvis jo funkcija nėra žinoma. Rnq1p prioninis domenas išsidėstęs baltymo C galiniame domene (153-402 amino rūgščių liekanos) (Sondheimer, Lindquist, 2000).  $[PIN^+]$  indukciją *de novo* palengvina 4°C temperatūra. Tokiomis pat sąlygomis indukuojasi ir  $[URE3]$  ( $[URE3]$  atsiradimo dažnis padidėja) bei  $[PSI^+]$  prionai (Chernoff ir kt., 1995; Bradley ir kt., 2002). Šio fenomeno mechanizmas nežinomas. Neatmetama galimybė, kad ilgalaikio šalčio šoko metu, kultūrai esant vėlyvoje stacionarinio augimo stadijoje, pakinta šaperonų pusiausvyra ir tai palengvina  $[PIN^+]$  indukciją. Pastebėta, kad po *de novo* indukcijos  $[PIN^+]$ , kaip ir kiti prionai, iš pradžių yra nestabilus (Bradley ir kt., 2002). Tikėtina, kad naujai indukuoti prionai turi praeiti tam tikrą brendimo stadiją, po kurios jie stabilizuojasi (Glover ir kt., 1997). Nors  $[PSI^+]$  gali suteikti ląstelei tam tikrų privalumų adaptuojantis stresinėmis sąlygomis, vis dėlto prionas inaktyvuoja didžiąją svarbaus transliacijos terminacijos faktoriaus dalį.  $[PIN^+]$  galbūt yra tas faktorius, kuris kontroliuoja  $[PSI^+]$  atsiradimo dažnį, palaiko jį tam tikrose ribose. Tuo pačiu reikia pažymėti, kad  $[PIN^+]$  faktorius neįtakoja  $[PSI^+]$  palaikymo ir plitimo ir negali veikti Sup35p jungimosi į prioninį agregatą.  $[PIN^+]$  svarbus tik indukuojantis  $[PSI^+]$  prionui (Derkatch ir kt., 2000).

$[PIN^+]$  fenotipą gali imituoti ir kiti prionai, palengvinantys  $[PSI^+]$  priono atsiradimą *de novo* (Derkatch ir kt., 2001). Parodyta, kad anksčiau atsiradęs prionas gali įtakoti heterologinio priono indukciją (Derkatch ir kt., 2001; Osherowish, Weissman, 2001). Sąveika gali būti sinergistinė arba antagonistinė, kaip, pavyzdžiui, yra  $[PSI^+]$  ir  $[URE3]$  prionų sąveikos atveju (Schwimmer, Masison, 2002).

Parodyta, kad esant ląstelėje  $[PSI^+]$  ir  $[URE3]$  prionams yra palengvinama  $[PIN^+]$  indukcija (teigiama sąveika), tačiau kai preegzistuojantis prionas yra  $[PIN^+]$ ,  $[PSI^+]$  ir  $[URE3]$  prionai tampa antagonistais – slopina vienas kito indukciją ir plitimą. Padidinta Hsp104 ir Hsp70

(Ssa2p) raiška mažai įtakoja šią sąveiką – šie šaperonai nėra limituojantis veiksnys, dėl kurio [PSI<sup>+</sup>] ir [URE3] prionai konkuruotų. Tačiau konstitutyvi padidinta Ssa1p, bet ne Ssa2p, raiška eliminuoja [URE3], nors tai yra gana homologiški, galintys pakeisti vienas kitą Hsp70 šaperonai. Pastebėta, kad esant ląstelėje [URE3], padidėja Hsp104 ekspresija, kas negali neįtakoti [PSI<sup>+</sup>] (Schwimmer, Masison, 2002).

### **2.2.5. Šaperonų įtaka mielių prionų indukcijai ir plitimui.**

Esminis faktorius, įtakojantis visų žinomų mielių prionų plitimą ([PSI<sup>+</sup>], [URE3], [RNQ<sup>+</sup>], yra molekulinis šaperonas Hsp104 (Chernoff ir kt., 1995; Moriyama ir kt., 2000; Sondheimer, Lindquist, 2000). Priono [PSI<sup>+</sup>] atveju ši priklausomybė yra gana neįprasta: tiek Hsp104 delecija, tiek jo padidinta raiška eliminuoja prioną iš ląstelės (Chernoff ir kt., 1995). Hsp104 šaperonas indukuojamas temperatūrinio šoko metu, ir viena jo funkcijų yra dalinai denatūruotų baltymų agregatų išardymas. Tikėtina, kad priono palaikymui reikalinga tam tikra optimali šaperono koncentracija (Ter-Avanesyan ir kt., 1998) Šaperono Hsp104 efektyviam veikimui reikia papildomų faktorių – Hsp70/Hsp40 sistemos. Pokyčiai agregato struktūroje, atsiradę dėl Hsp104 poveikio, nesant Hsp70/Hsp40 sistemos dažniausiai yra laikini. Šie šaperonai tirpina mažus agregatus, susidariusius po Hsp104 poveikio. (Glover, Lindquist, 1998).

Mielėse yra identifikuoti 4 karščio šoko indukuojami SSA genai: jie koduoja Hsp70 šeimos baltymus (Craig ir kt., 1995). Šie genai yra labai panašūs, tačiau jų raiškos lygiai skirtingi. SSA1, 3 ir 4 kaip ir HSP104 genų produktai dalyvauja šiluminio šoko atsake. Visų keturių SSA genų delecija yra letali, tačiau vieno geno visiškai pakanka ląstelės gyvybingumui palaikyti. Manoma, kad Ssa1p apsaugo [PSI<sup>+</sup>] stresinėmis sąlygomis nuo streso indukuojamų faktorių poveikio, pavyzdžiui, Hsp104 poveikio. SSA1 arba SSA2, arba jų abiejų delecija [PSI<sup>+</sup>] priono neįtakoja. Vis dėlto didžioji duomenų dalis rodo, kad Hsp70 (bent jau Ssa pošeimis) dalyvauja [PSI<sup>+</sup>] priono palaikyme (Jung ir kt., 2000).

### **2.2.6. Prionų įtaka mielių ląstelės gyvybingumui. Prionų biologinis vaidmuo.**

Nors prionai tyrinėjami jau daugiau nei dešimt metų, apie jų biologinę svarbą žinoma labai mažai. Daugelio baltymų, turinčių prioninį domeną (PrD) ir galinčių prionizuotis, funkcijos lieka kol kas nežinomos. Netgi tokių pakankamai gerai ištyrinėtų baltymų kaip Sup35p ir Ure2p prionizacijos biologinis vaidmuo vis dar neaiškus.

[URE3] ląstelėms gali turėti dvejopą reikšmę. Iš vienos pusės, [URE3] prionas ir ure2 mutacijos mažina ląstelės augimo greitį (Wickner, 1994), tačiau tokios ląstelės gali panaudoti

platesnį azoto šaltinių spektrą. Be to, *ure2* mutantai druskingoje terpėje auga geriau, nei laukiniai kamieniai. Tai rodo adaptacinę [*URE3*] priono reikšmę (Edskes, 2001).

[*URE3*] prionas mažina ląstelių augimo greitį, tuo tarpu [*PSI*<sup>+</sup>] prionas neturi įtakos ląstelių eksponentinio augimo greičiui, tačiau turi įtakos transliacijai. Kai kuriuose mielių kamienuose, [*PSI*<sup>+</sup>] prionas sumažina stacionarioje fazėje esančių ląstelių gyvybingumą. Buvo nustatyta, kad [*PSI*<sup>+</sup>] priono sukelta stacionarios fazės ląstelių žūtis priklauso nuo oksidacijos procesų. Antioksidantų, superoksido dismutazės ir katalazės genų padidinta raiška iš dalies gali neutralizuoti toksišką [*PSI*<sup>+</sup>] priono poveikį ląstelių gyvybingumui. [*PSI*<sup>+</sup>] toksiškumas stacionarios fazės ląstelėms būdingas tik tam tikruose mielių kamienuose (Chernoff, 2001).

[*PSI*<sup>+</sup>] prionas taip pat yra toksiškas ląstelėms, kuriose yra padidinta Sup35p raiška. Tokiu atveju yra slopinamas [*PSI*<sup>+</sup>] ląstelių augimas. Padidinta Sup35 baltymo ar jo fragmento, turinčio prioninį domeną, raiška taip pat slopina [*psi*<sup>-</sup>] kamienų augimą (Chernoff ir kt., 1992).

Kai kurių kamienų ląstelės, turinčios [*PSI*<sup>+</sup>] prioną, tampa šiek tiek atsparesnės GuHCl poveikiui. Tai buvo parodyta *ssb1.2* Δ kamienuose, kurie pasižymi dideliu jautrumu GuHCl. Buvo pastebėta, kad kamieno reakcija į toksinį agentą priklauso nuo genetinio fono (True, Lindquist, 2000). Manoma, taip yra todėl, kad eksperimentuose naudotiems skirtingos kilmės kamienams būdingas nevienodas spektras „tylinčių“ genų, kurie turi nonsens mutacijas. [*PSI*<sup>+</sup>] gali tuos genus aktyvuoti (Chernoff, 2001; Lindquist, 2000; True, Lindquist, 2000). Tokiu būdu [*PSI*<sup>+</sup>] faktorius gali atskleisti paslėptas mutacijas ar jų kombinacijas.

Įdomu, kad prionizuota Sup35p forma pastebėta kol kas tik laboratoriniuose kamienuose (Chernoff ir kt., 2000). Nepaprastai intriguoja tas faktas, kad [*PSI*<sup>+</sup>] priono atsiradimas ląstelėje sukelia gana platų fenotipinių pokyčių spektrą priklausomai nuo ląstelės genetinio fono (True, Lindquist, 2000). Skirtingos kilmės mielių kamienų [*psi*<sup>-</sup>] ir [*PSI*<sup>+</sup>] variantų palyginimas atskleidė, kad kai kurių [*PSI*<sup>+</sup>] variantų kamieniai yra atsparesni šiluminiam stresui, aukštoms etanolio koncentracijoms, sunkiesiems metalams ir antibiotikams nei izogeniniai neprionizuoti kamieniai. Taip pat kai kurie [*PSI*<sup>+</sup>] kamieniai lengviau ištvėria žemą terpės pH. Visa tai žinoma suteikia didžiulį pranašumą prionizuotoms ląstelėms. Taigi vienuose kamienuose [*PSI*<sup>+</sup>] yra adaptyvus, o kituose neadaptyvus (True, Lindquist, 2000). Sup35p neprioninės formos perjungimas į prioninę, gali suteikti mielių ląstelei pranašumą išgyvenant kintančioje aplinkoje, todėl tikėtina, tai yra naujų požymių evoliucijos pavyzdys (Sherman, 2004).

### 2.3. Signalinio Ras/PKA kelio sąveika su prionais

Prionai sukelia ląstelėje stresą, tai pripažintas faktas. Dideli prioniniai agregatai turi panašumų su denatūruotų baltymų sancaupomis, taipogi sužadina šaperonų veiklą ir įmanoma tokiu būdu galėtų veikti Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą. Parodyta, kad G baltymų (Ras)

guanidino nukleotidų pakaitos (GEF) faktoriaus Cdc25p aktyvumas tiesioginiu būdu teigiamai reguliuojamas Ssa1p (Hsp70 šeima) šaperonais, todėl galima numanyti, kad denatūruoti baltymai, besikaupiantys streso sąlygomis, gali sumažinti Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą nutitruodami šaperonus ir tokiu būdu neleisdami jiems sąveikauti su Cdc25p, aktyvuoti Ras baltymų bei adenilatciklazės (Iguai, Estruch, 2000; Thevelein, 1994).

Ras/PKA signalinis kelias yra pirmasis, kurio įtaką priono formavimuisi pavyko atskleisti. Mks1 baltymas yra azoto reguliavimo kaskados narys, kuris neigiamai veikia Ure2 funkciją ir turi įtakos [URE3] priono indukcijos efektyvumui. Ląstelėse, kuriose pašalintas *MKS1* genas, [URE3] *de novo* nesusidaro (Edskes ir kt., 1999). Mks1p yra neigiamas Ras-PKA kelio reguliatorius ir pats kelias neigiamai veikia Mks1 baltymą. Todėl buvo iškelta hipotezė apie ląstelių signalinių sistemų įtaką prionų susidarymui. Eksperimentiniai duomenys patvirtino, kad, Ras/PKA kelias turi įtakos [URE3] priono formavimosi efektyvumui: aktyvaus *RAS2* alelio *RAS2<sup>val19</sup>* padidinta raiška slopina [URE3] atsiradimą ląstelėje (Edskes ir Wickner, 2000). Ras/PKA signalinio kelio įtaka kitų prionų formavimuisi nėra žinoma, tačiau egzistuojančių atskirų genetinių sistemų, kurios gali būti reguliuojamos Ras/PKA keliu (Mks1, Hsp104 ir Ssa1), o taip pat reguliuojamo signaliniu keliu priono [URE3] sąveikos su kitais prionais – [PIN<sup>+</sup>] ir [PSI<sup>+</sup>], bei [PSI<sup>+</sup>] priono indukcijos palengvinimas leidžia įtarti egzistuojant platesnį šio kelio molekulinį taikinių ratą.

### 3. MEDŽIAGOS IR METODAI

#### 3.1. Medžiagos

##### 3.1.1. Reagentai

ACROS ORGANICS	uracilas.
BIOKAR DIAGNOSTICS, Prancūzija	vandeninis peptonas, agaras
BIO-RAD, JAV	agarozė
FLUKA, Šveicarija	TRIS
LACHEMA, Čekija	acto rūgštis, CaCl <sub>2</sub> , HCl, KOH, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaOH
MACHENEREY-NAGEL, Vokietija	DNR skyrimo rinkinys.
MBI "Fermentas", Lietuva	restrikcijos ir ligavimo fermentai bei buferiai, DNR ekstrakcijos rinkinys, DNR ilgio standartai
MERCK, Vokietija	Ampicilinas, imersinė alyva, kalio acetatas, KCl, MgCl <sub>2</sub> , natrio acetatas, NaCl, PEG 4000; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×3H <sub>2</sub> O.
OXOID, Anglija	Peptonas, mielių ekstraktas
REANAL, Vengrija	bromfenolio mėlis, leucinas, prolinas.
SIGMA, JAV	EDTR, etidžio bromidas, PI, ribonukleazė A, PIPES.
AB "VILNIAUS DEGTINĖ", Lietuva	etanolis
PEAXИM, Rusija	D-gliukozė, I <sub>2</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , KI, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O.
ROTH, Vokietija	DMSO, NDS, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

##### 3.1.2. Mielių ir bakterijų kamienai, plazmidės

Mielių <i>S. cerevisiae</i> kamienai	Santrumpa	Šaltinis
7A-P192 – <i>MATa ade1-6<sup>UAA</sup> his7-1<sup>UAA</sup> met13-A1[PIN<sup>+</sup>][psi-][URE3?]</i>		1
$\alpha'$ 1-1JA-NB13 <sup>-</sup> – <i>MAT<math>\alpha</math> leu2<sup>UAA</sup>[PIN<sup>+</sup>][psi-][URE3?]</i>	NB13 <sup>-</sup>	2
$\alpha'$ 1-1JA-NB13 – <i>MAT<math>\alpha</math> leu2<sup>UAA</sup>[PIN<sup>+</sup>][psi-][URE3?]</i>	NB13	2
6- $\alpha'$ 1-1JA-NB13 <sup>-</sup> $\Delta$ leu <sup>-</sup> – <i>MAT<math>\alpha</math> leu2<sup>UAA</sup> <math>\Delta</math>ura3 [PIN<sup>+</sup>][psi-][URE3?]</i>	6	3
12- $\alpha'$ 1-1JA-NB13 <sup>-</sup> $\Delta$ leu <sup>-</sup> – <i>MAT<math>\alpha</math> leu2<sup>UAA</sup> <math>\Delta</math>ura3 [PIN<sup>+</sup>][psi-][URE3?]</i>	12	3
$\alpha'$ 1-1JA-NB13 $\Delta$ 7-1 – <i>MAT<math>\alpha</math> leu2<sup>UAA</sup> <math>\Delta</math>ura3 [PIN<sup>+</sup>][psi-][URE3?]</i>	7	
<i>SPI<math>\Delta</math>ras2 – MATa his3 ura3 trp1 ade8 can ras2::LEU2</i>	<i>SPI<math>\Delta</math>ras2</i>	4

1. Andrianova ir Inge-Vechtomov, 1988; 2. Citavicius, 2001; 3. Šis darbas, 4. gauta iš dr. D. Engelberg'o.

✚  $\alpha'$ 1-1JA-NB13<sup>-</sup> yra kilęs iš  $\alpha'$ 1-1JA (*MAT $\alpha$  leu2<sup>UAA</sup>*) kamieno.

✚  $\alpha'$ 1-1JA-NB13<sup>-</sup>  $\Delta$ leu<sup>-</sup> kamienas buvo gautas įvedus  *$\Delta$ ura3* deleciją į  $\alpha'$ 1-1JA-NB13<sup>-</sup> kamieną.

✚  $\alpha'$ 1-1JA-NB13  $\Delta$ 7-1 kamienas buvo gautas įvedus  *$\Delta$ ura3* deleciją į  $\alpha'$ 1-1JA-NB13 kamieną.

✚  $\alpha'$ 1-1JA-NB13<sup>-</sup>  $\Delta$ leu<sup>-</sup> 12 kamienas yra kilęs iš  $\alpha'$ 1-1JA-NB13<sup>-</sup>  $\Delta$ leu<sup>-</sup> kamieno.

## Bakterijų *E. coli* kamienas

ER2267 *F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15 zzzf::mini-Tn10(Km<sup>R</sup>)/e14' (mcrA) endA1 supE44 thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 Δ(argF-lac)UI169 recA1* (E. Raleigh, nepublikuota), gautas iš Dr. A. Lubio.

## Plazmidės

YEp24-ADC1-CYR1 (darbe vadinama: YEp24-CYR1) -  $2\mu$  URA3 ampR wtCYR1 – gauta iš T. Kataoka.

pMW2 (darbe vadinama: pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup>) - CEN URA3 RAS2(Gly19Val) – gauta iš J.Heitman.

pXP1 (darbe vadinama: pXP1-BCY1) -  $2\mu$  URA3 ampR wtBCY1 – gauta iš J.Heitman.

pXP2 (darbe vadinama: pXP2-TPK1) -  $2\mu$  URA3 ampR wtTPK1 – gauta iš J.Heitman.

pXP3 (darbe vadinama: pXP3-TPK2) -  $2\mu$  URA3 ampR wtTPK2 – gauta iš J.Heitman.

pXP4 (darbe vadinama: pXP4-TPK3) -  $2\mu$  URA3 ampR wtTPK3 – gauta iš J.Heitman.

## 3.1.3. Terpės

Sudėtis nurodyta 1 l vandens

YPD	gliukozė	20 g
	peptonas	20 g
	mielių ekstraktas	10 g
	agaras	20 g

### MDam

(azoto šaltinis - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,23 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
gliukozė	20 g
agaras	20 g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ruošiamas sterilus 50× tirpalas ir dedamas į išautoklavuotą terpę, kartu su steriliais mielių genotipą atitinkančių azoto bazių bei aminorūgščių tirpalais, kaip nurodyta (Sherman ir kt., 1986), ir steriliu vitaminų tirpalu.

### MDpro

(azoto šaltinis - prolinas)

Prolinas	2 g
----------	-----

(prolino koncentracija parinkta pagal Masison ir kt., 1997)

Terpės sudėtis identiška MDam, tik vietoje (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, į terpę dedama prolino – taip pat ruošiamas sterilus 50× tirpalas ir dedamas į išautoklavuotą terpę kartu su steriliais mielių genotipą atitinkančių azoto bazių bei aminorūgščių tirpalais, kaip nurodyta (Sherman ir kt., 1986), ir steriliu vitaminų tirpalu.

Minimali terpė	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
(selektyvi terpė mielių transformantams auginti)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1 g
	gliukozė	20 g
	agaras	20 g

Terpės autoklavuotos 30 min. 121°C, tirpalai - 15 min. 112°C

### 3.1.4. Tirpalai, buferiai ir kitos priemonės

1000× vitaminų tirpalas	β-Alaninas	0,5 g/l
	biotinas	2 mg/l
	tiaminas	0,2 g/l
Jodo tirpalas	KI	0,4%
	metalinis I <sub>2</sub>	0,2%
PEG/LiCl/TE	45% PEG4000	90 ml
	1 M LiCl	10 ml
	1 M TRIS-HCl (pH 7,5)	1 ml
	0,5 EDTA	0,2 ml
	PEG autoklavuojamas, kiti tirpalai filtruojami.	
PBS, pH 7,4	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,68 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l
Propidžio jodidas	50 μM propidžio jodidas	

## 3.2. Metodai

### 3.2.1. Genetikos metodai

#### Klasikiniai metodai

Genotipo nustatymas buvo atliekamas pagal standartines metodikas (Sherman ir kt., 1986).

#### Molekuliniai metodai

Plazmidžių transformacija į *E. coli* ir išskyrimas buvo atliekamas pagal standartines metodikas (Sambrook ir kt., 1989).

*Mielių kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija.* Mielių ląstelių transformacija buvo atliekama pagal Elbe (1992) metodiką su kai kuriomis modifikacijomis. Naktinė mielių kultūra 1:5 santykiu persėjama į skystą YPD terpę ir 3-4 val. auginama aeruojant 30°C, kol suspensijos koncentracija pasiekia 10<sup>8</sup> ląst./ml. 0,5 ml tokios suspensijos centrifuguota 10 s Eppendorf tipo centrifugoje. Nupylus supernatantą į mėgintuvėlį buvo pridėdama 10 μl DNR nešėjo ir 1-5 μg transformuojamos DNR. Ląstelės užpilamos 0,5 ml PEG/LiCl/TE tirpalo ir kambario temperatūroje inkubuojamos per naktį. Nucentrifugavus 3000 aps./min. greičiu 3 min., ląstelės



plaunamos steriliu vandeniu, užpilamos 0,5 ml YPD terpės ir po 6-12 val. inkubavimo 30°C išsėjamos ant selektyvios MD terpės. Transformantai auginti 5–7 paras 30°C.

#### Mielių transformantų augimo sąlygos

Mielių transformantai buvo auginami ant selektyvios minimalios be uracilo terpės su genotipą atitinkančiais aminorūgščių priedais.

### **3.2.2. Ras-PKA signalinio kelio fenotipų analizės metodai**

#### Atsparumas karščio šokui

Mielių ląstelių išgyvenimas po karščio šoko 55°C buvo nustatomas pagal modifikuotą Broek ir kt. (1987) metodą. 2 paras 30°C augintos mielių kultūros nuo YPD terpės buvo perspausdinamos ant įkaitintų (ne mažiau kaip 4 val.) 55°C temperatūroje YPD lėkštelių ir inkubuojamos 55°C 15, 25, 35 bei 45 min. Kontrolinė lėkštelė buvo laikoma kambario temperatūroje. Po inkubacijos lėkštelės atvėsintos kambario temperatūroje ir toliau inkubuotos 30°C termostate. Atsparumas karščio šokui buvo vertinamas vizualiai pagal kultūrų augimą po 24 ir 48 val. Kontrolei naudoti 7A-P192 ir SP1Δ*ras2* - jautrus ir atsparus karščio šokui mielių kamienai.

#### Glikogeno kaupimas

Kokybiškai glikogeno kaupimas mielių kultūrose buvo vertinamas pagal tai, kaip intensyviai jas nudažo jodo tirpalas. 2 paras 30°C augintos mielių kultūros nuo YPD (pradiniams ir plazmidę pametusiams, bei kontroliniams kamienams) arba minimalios (plazmidėmis transformuotiems kamienams) terpių buvo persėjamos ant atitinkamų terpių. Atgaivintos kultūros buvo atsėjamos ant YPD terpės ir auginamos 2 paras 30°C temperatūroje. Glikogeno kaupimasis ląstelėse vertintas vizualiai, užpylus kultūras jodo tirpalu pagal spalvos pasikeitimą po 3 min.

### **3.2.3. [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos analizės metodai**

#### Gyvybingumo įvertinimas

Ląstelių gyvybingumo įvertinimui ant 2 paras 30°C augintos mielių kultūros nuo selektyvios minimalios su uracilu (pradiniams kamienams) ir be uracilo (transformantams)) terpių buvo persėjamos ant atitinkamų terpių dar 2 paroms. Atgaivintos kultūros atsėjamos ant MDam ir MDpro be leucino (atitinkamai su uracilu pradiniams kamienams ir be uracilo –transformantams) terpių ir inkubuojamos 5 paras 30°C temperatūroje. Nedidelis ląstelių kiekis buvo plaunamas PBS buferiu, suspenduojamas propidžio jodido tirpale, paskleidžiamas ant objektyvio stiklelio,

greitai uždengiamas dengiamuoju stikleliu ir tuoj pat analizuojamas fluorescencinės (bangos ilgis: >560 nm) mikroskopijos pagalba. Ląstelių gyvybingumas išreikštas nesidažančių ląstelių procentine dalimi nuo visų ląstelių.

#### [PSI<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnio įvertinimas

Kamienų priono indukcijos (prionizacijos) dažnio įvertinimui buvo išsėjama 10<sup>5</sup> ląstelių ant MD be leucino terpės ir po 21 paros inkubavimo 30°C termostate įvertinamas išaugusių kolonijų skaičius. Kultūros prieš eksperimentą buvo atgaivinamos gyvybingumo įvertinimo metodikoje nurodytu būdu. Prionizacijos dažnis apskaičiuotas atsižvelgiant į kultūros gyvybingumo MDam ir MDpro be leucino terpėse po 5 parų inkubacijos duomenis, bei išreikštas išaugusių kolonijų ir gyvų ląstelių santykiu.

#### **3.2.4. Mikroskopija**

Atlikta Olympus Provis AX70TRF (Olympus, Japonija) mikroskopu. Ląstelės buvo fotografuojamos skaitmenine Hamamtsu C4742-95-10NR kamera; padidinimas: ×1000.. Užlašinus lašą imersinės alyvos, preparatas buvo stebimas imersiniu objektyvu UPlanApo 100X /1,35 Oil Iris.

## 4. Rezultatai

Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas mielėse *S. cerevisiae* įtakoja labai daug gyvybiškai svarbių funkcijų. Mutacijos, kurių pasekoje pakinta signalinio kelio aktyvumas, sąlygoja smarkius metabolizmo pokyčius ir pasižymi pleotropiniu poveikiu.

Ankstesniuose laboratorijos darbuose buvo parodyta, kad [*PSI*<sup>+</sup>] priono stiprūs variantai suteikia padidintu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu pasižyminčio NB13<sup>-</sup> kamieno ląstelėms adaptacinių savybių – stresinėse sąlygose [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>] variantai geriau auga ir jų ląstelės yra gyvybingesnės nei izogeniniai [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>] kamieniai.

Šiame darbe siekta nustatyti, kokie Ras/PKA signalinio kelio komponentai įtakoja NB13 kamienų fenotipinius sutrikimus, bei įvertinti signalinio kelio aktyvumo pokyčių įtaką [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijai.

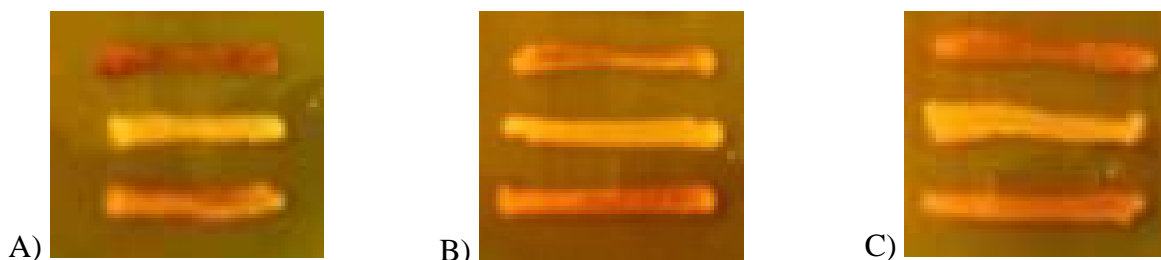
### 4.1. Kamienų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.

Darbai pasirinkti trys mielių *Saccharomyces cerevisiae* kamieniai, pasižymintys Ras/PKA signalinio kelio sutrikimais: 6- $\alpha$ '1-1JA-NB13<sup>-</sup>  $\Delta$ leu<sup>-</sup>, 12- $\alpha$ '1-1JA-NB13<sup>-</sup>  $\Delta$ leu<sup>-</sup>,  $\alpha$ '1-1JA-NB13  $\Delta$ 7-1 kamieniai (toliau vadinami 6, 12 bei 7). Kamieniai buvo vertinami pagal standartinius fenotipus, kurie charakterizuoja Ras/PKA kelio aktyvumą:

- ✚ Glikogeno kaupimą;
- ✚ Atsparumą karščio šokui.

**Glikogeno kaupimas** buvo įvertintas kokybiškai, nudažius kultūras vandeniniu jodo tirpalu. Gautos rudos spalvos intensyvumas charakterizuoja kultūros ląstelių gebėjimą kaupti glikogeną.

Po 3 minučių inkubacijos 6 kamienas vandeniniu jodo tirpalu dažosi tamsiai ruda spalva (8 pav., A), o 7 kamienas – šviesiai ruda (8 pav., C). 12 kamieno dažosi šviesiausiai – gelsvai ruda spalva (8 pav., B). Pagal glikogeno kaupimo testą galima išrikiuoti šiuos tris kamienus nuo didesnio (tamsiai ruda spalva) iki mažesnio (gelsvai ruda spalva), kas atitinkamai gali rodyti Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo lygmenį

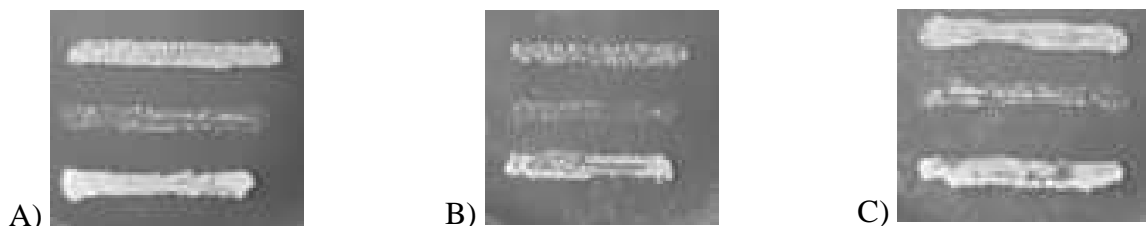


8 pav. Tiriamųjų 6, 12, 7 kamienų glikogeno dažymas.

(sėjimo tvarka nuotraukoje nuo viršaus iki apačios – tiriamasis kamienas, 7A-P192 kamienas, *SPI1*/*ras2* kamienas)

- A) 6 kamieno glikogeno dažymas;
- B) 12 kamieno glikogeno dažymas;
- C) 7 kamieno glikogeno dažymas.

**Atsparumas karščio šokui** buvo nustatomas kultūras inkubuojant standartinėmis (15-25 min.) ir sugriežtintomis (35-45 min.) sąlygomis 55°C temperatūroje. Po 48 val. vizualiai buvo vertinamas kultūrų augimas (9 pav).



**9 pav.** Tiriamųjų 6, 12, 7 kamienų karščio šoko (25 min. 55°C temperatūroje) bandymas. (sėjimo tvarka nuotraukoje nuo viršaus iki apačios – tiriamasis kamienas, 7A-P192 kamienas, *SPI1**ras2* kamienas)

- A) 6 kamieno karščio šoko (25 min. 55°C temperatūroje) bandymas;
- B) 12 kamieno karščio šoko (25 min. 55°C temperatūroje) bandymas;
- C) 7 kamieno karščio šoko (25 min. 55°C temperatūroje) bandymas.

Palyginus dažymosi vandeniniu jodo tirpalu ir atsparumo karščio šokui rezultatus, tiriamuosius kamienus pagal Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą galima charakterizuoti taip: 6 kamienas pasižymi didesniu Ras/PKA kelio aktyvumu, 7 kamienas – vidutiniu, o 12 kamienas rodo sumažintą Ras/PKA kelio aktyvumą.

#### **4.1.1. 6 kamieno ir jo transformantų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.**

##### **6 YEp24-CYRI**

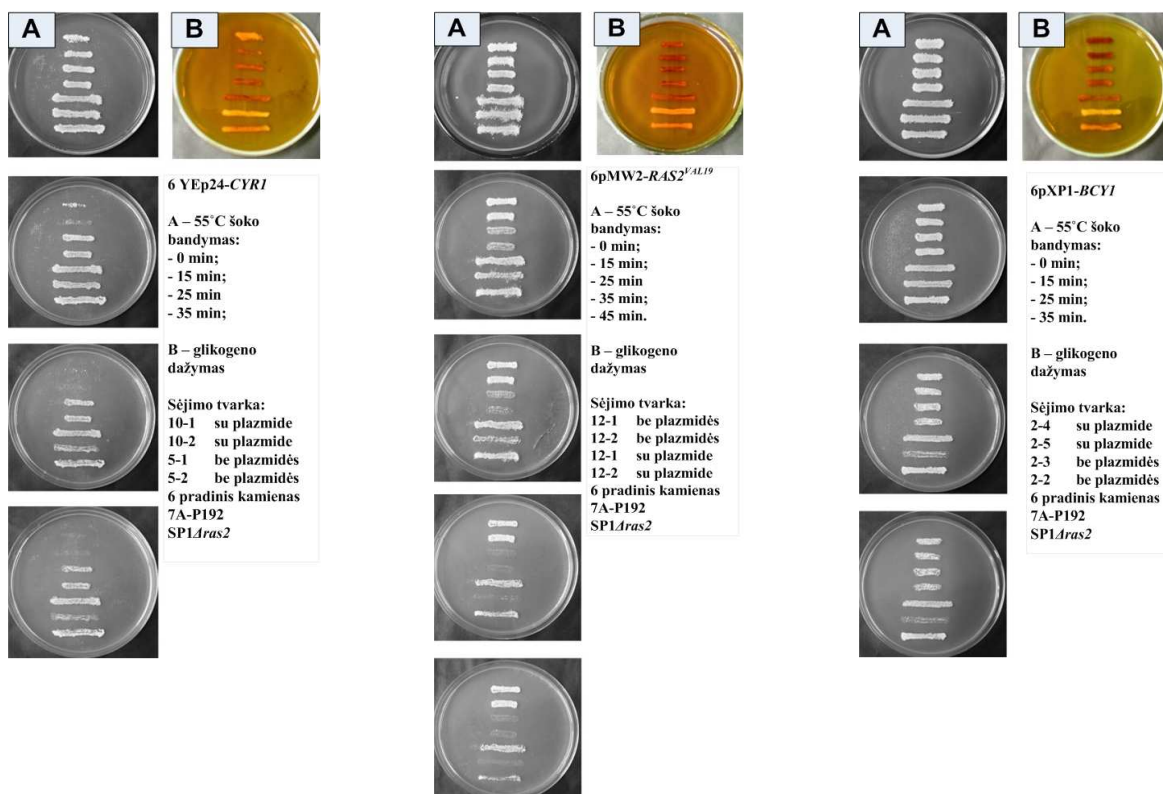
Pagal glikogeno kaupimą 6 YEp24-CYRI transformantai skiriasi nuo pradinio 6 kamieno – 10-1 klonas turintis plazmidę vandeninio jodo tirpale dažosi šviesiau nei pradinis kamienas. Tai liudija, kad įvedus *wtCYRI* geną į 6 kamieno ląsteles Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas padidėja. Tuo pačiu reikia pažymėti, kad karščio šoko testas patvirtina glikogeno dažymo testo rezultatus, skirtumas tarp transformantų bei pradinio 6 kamieno išryškėja jau po 15 min inkubacijos 55°C temperatūroje. 6 YEp24-CYRI transformantai yra jautrūs karščio šokui. Pametusiųjų plazmidę klonų fenotipas atsistato. Taigi, sprendžiant iš glikogeno dažymo ir karščio šoko testo rezultatų *wtCYRI* genas didina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą 6 kamieno ląstelėse (10 pav.).

##### **6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup>**

Vertinant glikogeno dažymo rezultatus, skirtumų tarp pradinio kamieno ir transformantų nepastebėta – visi dažosi vienodai. Tačiau karščio šoko testas rodo, kad transformantai yra jautresni nei pradinis kamienas ir pametę plazmidę klonai. Šie skirtumai išryškėja po 15-25 min. inkubacijos 55°C temperatūroje. Taigi, karščio šoko rezultatai rodo, kad dominantinio kointegravimosi aktyvaus *RAS2<sup>VAL19</sup>* alelio raiška didina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą 6 pradinio kamieno ląstelėse (11 pav.).

## 6pXP1-BCY1

6pXP1-*BCY1* transformantų dažymas vandeniniu jodo tirpalu rodo padidėjusį glikogeno kaupimą ląstelėse, tačiau karščio šoko rezultatai to nepatvirtina. Transformanto klonai ir eliminantai yra vienodai atsparūs karščio šokui. Gauti rezultatai rodo, kad wt*BCY1* geno raiška neįtakoja Ras/PKA kelio aktyvumo 6 kamieno ląstelėse (12 pav.). Taip pat įmanoma, kad bandymo metu naudotos temperatūros nepakako skirtumams išryškinti.



**10 pav.** 6YE24-*CYR1* transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

**11 pav.** 6pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

**12 pav.** 6pXP1-*BCY1* transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

## 6pXP2-TPK1

Testuojant 6pXP2-*TPK1* transformantus dėl glikogeno kaupimo, jokių pokyčių nepastebėta – transformantai, pametę plazmidę klonai ir pradinis 6 kamienas vandeninio jodo tirpale dažosi vienodai. Vertinant karščio šoko rezultatus, pastebėta, kad transformantai yra jautresni, nei pradinis kamienas, o tai liudija, kad Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas 6pXP2-*TPK1* transformantų ląstelėse padidėjo. Taigi, wt*TPK1* geno raiška padidina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą 6 pradinio kamieno ląstelėse (13 pav.).

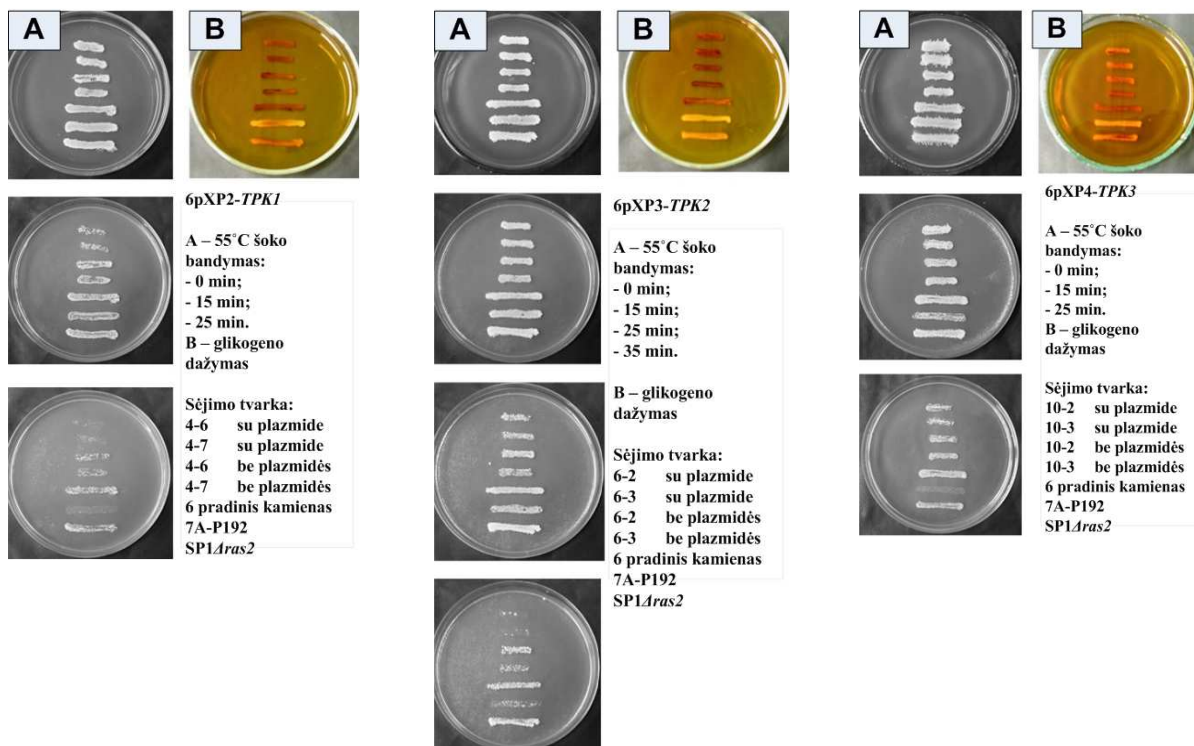
## 6pXP3-TPK2

6pXP3-*TPK2* transformantų glikogeno dažymo testas nerodo pastebimų transformantų ir pradinio kamieno skirtumų. Karščio šoko testo rezultatai liudija, kad skirtumai yra, bet jie pasireiškia tik po 35 min. ekspozicijos 55°C temperatūroje. 6pXP3-*TPK2* transformantų kultūra

yra jautresnė karščio šokui nei pradinio kamieno bei pametusių plazmidė klonų kultūros. Taigi, karščio šoko rezultatai parodo, kad *wtTPK2* geno raiška 6 pradinio kamieno ląstelėse didina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą (14 pav.).

### 6pXP4-TPK3

Šiuo atveju nei glikogeno dažymo, nei karščio šoko testas nerodo jokių fenotipinių skirtumų lyginant transformantus su pradiniu kamienu bei klonais, pametusiais plazmidę. Tai rodo, kad *wtTPK3* geno raiška neįtakoja Ras/PKA kelio aktyvumo 6 pradinio kamieno ląstelėse (15 pav.).



**13 pav.** 6pXP2-TPK1 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

**14 pav.** 6pXP3-TPK2 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

**15 pav.** 6pXP4-TPK3 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

#### 4.1.2. 12 kamieno ir jo transformantų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.

### 12 YEp24-CYRI

Vertinant transformantų ir pradinio kamieno dažymosi intensyvumą vandeniniame jodo tirpale, skirtumų nepastebėta. Tuo tarpu karščio šoko testo rezultatai rodo, kad transformantų jautrumas karščio šokui yra padidėjęs palyginus su pradiniu kamienu ir klonais, pametusiais plazmidę. Seka išvada, kad *wtCYRI* geno raiška 12 kamieno ląstelėse didina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą (16 pav.).

### 12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup>

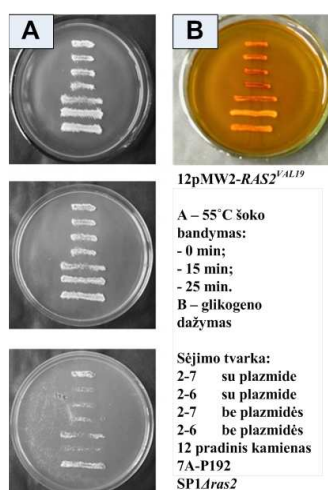
12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų atveju glikogeno dažymo testas pastebimų skirtumų neparodė, o karščio šoko rezultatai yra priešaringi – 2-7 klonas su plazmide yra atsparus karščio šokui, tuo tarpu 2-6 klonas yra jautrus, bet mažai skiriasi nuo pradinio kamieno. Todėl negalima tvirtinti, kad RAS2<sup>VAL19</sup> alelio raiška įtakoja Ras/PKA kelio aktyvumą 12 kamieno ląstelėse (17 pav.).

### 12pXP1-BCY1

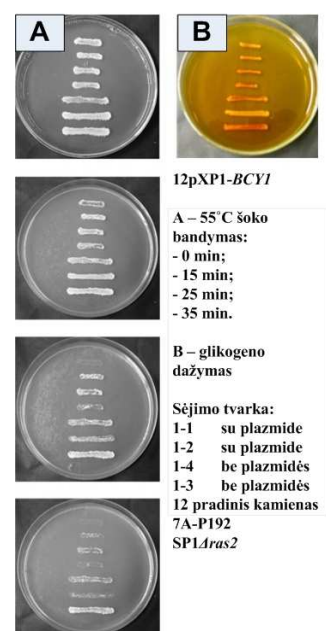
Vertinant glikogeno dažymo testo rezultatus reikia pažymėti, kad jie yra nevienareikšmiai, tačiau patikimų skirtumų tarp transformantų ir pradinio kamieno nenustatyta. Transformantų jautrumas karščio šokui taipogi nepadidėjęs, todėl daroma išvada, kad wtBCY1 genos įvedimas į 12 kamieno ląsteles neįtakoja Ras/PKA kelio aktyvumo jose (18 pav.).



**16 pav.** 12 YE p24-CYR1 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.



**17 pav.** 12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.



**18 pav.** 12pXP1-BCY1 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

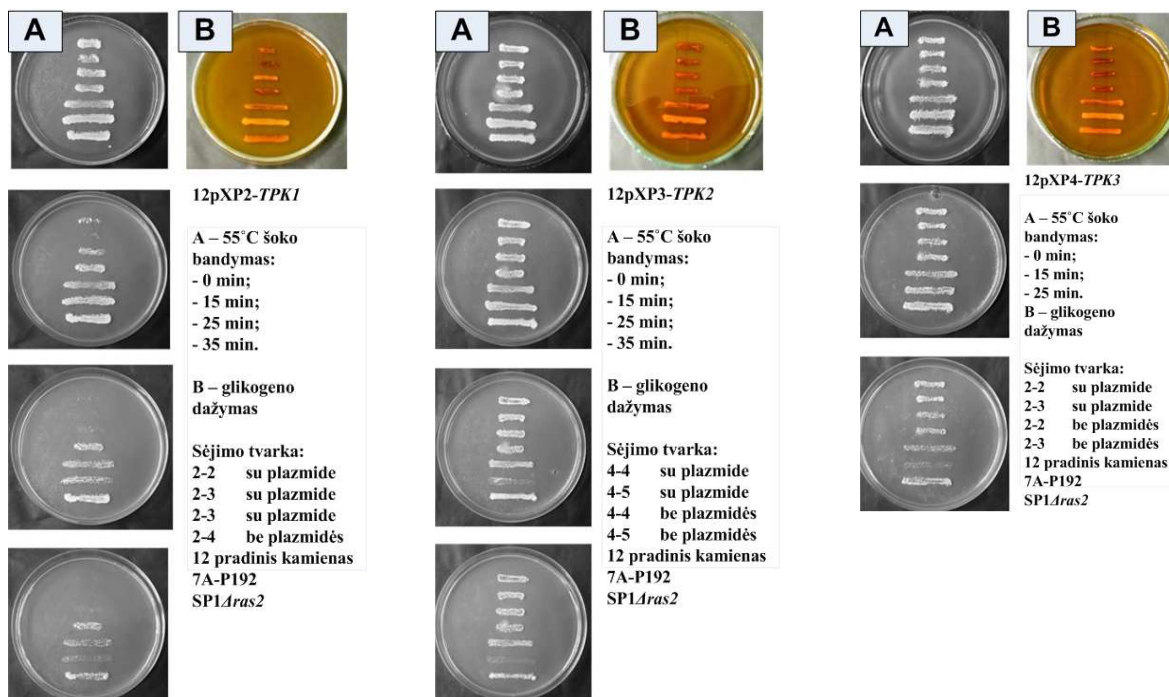
### 12pXP2-TPK1

12pXP2-TPK1 transformantų glikogeno dažymas nerodo jokių fenotipinių pokyčių, tačiau karščio šoko rezultatai liudija priešingai, Transformantai yra jautresni karščio šokui nei pradinis kamienas. Todėl seka išvada, kad 12pXP2-TPK1 raiška padidina Ras/PKA kelio aktyvumą 12 kamieno ląstelėse (19 pav.).

### 12pXP3-TPK2 ir 12pXP4-TPK3

Nei glikogeno dažymas, nei karščio šoko testas nerodo pokyčių transformantų ląstelėse, tai reiškia, kad wtTPK2 ir wtTPK3 genų raiška neįtakoja Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo 12 kamieno ląstelėse (20 ir 21 pav.).





**19 pav.** 12pXP2-*TPK1* transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

**20 pav.** 12pXP3-*TPK2* transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

**21 pav.** 12pXP4-*TPK3* transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

#### 4.1.3. 7 kamieno ir jo transformantų atsparumo stresui ir glikogeno kaupimo analizė.

##### 7 YEp24-*CYR1*

Glikogeno dažymo ir karščio šoko testų rezultatai vienareikšmiškai rodo, kad 7 YEp24-*CYR1* transformanto ląstelėse, Ras/PKA kelio aktyvumas yra padidėjęs – transformantai dažosi šviesiau nei pradinis 7 kamienas ir yra jautresni karščio šokui (22 pav.).

##### 7pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup>

Abiejų testų rezultatai rodo, nepakitusį Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą – transformantai, pametę plazmidę klonai ir pradinis 7 kamienas vienodai dažosi ir yra atsparūs karščio šokui. Taigi, *RAS2*<sup>VAL19</sup> alelio raiška neįtakoja Ras/PKA kelio aktyvumo šio kamieno ląstelėse (23 pav.).

##### 7pXP1-*BCY1*

7pXP1-*BCY1* atveju glikogeno kaupimo bei atsparumo karščio šokui testai fenotipinių pokyčių neparodo, todėl daroma išvada, kad Ras/PKA kelio aktyvumas yra nepakitęs transformanto ląstelėse (24 pav.).

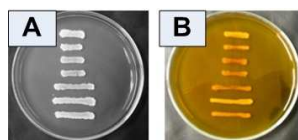
##### 7pXP2-*TPK1*

Glikogeno dažymo testas nerodo jokių pokyčių, tuo tarpu karščio šoko testo rezultatai liudija, kad signalinio kelio aktyvumas 7pXP2-*TPK1* transformantų ląstelėse yra padidėjęs – skirtumai išryškėja po 35 min. ekspozicijos 55°C temperatūroje (25 pav.).



## 7pXP3-TPK2 ir 7pXP4-TPK3

7pXP3-TPK2 transformantų atveju nei glikogeno kaupimo, nei atsparumo karščio šokui testai nerodo jokių pokyčių 7 kamieno ląstelėse po plazmidės įvedimo. 7pXP4-TPK3 transformantų testavimo rezultatai analogiški (26 ir 27 pav.).



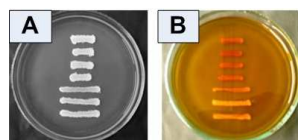
**7 YEp24-CYR1**  
A – 55°C šoko bandymas:  
- 0 min;  
- 15 min;  
- 25 min;  
- 35 min;  
- 45 min.

B – glikogeno dažymas  
Sėjimo tvarka:  
7-1 su plazmide  
7-2 su plazmide  
7-2 be plazmidės  
7-3 be plazmidės

7 pradinis kamienas  
7A-P192  
SP1Aras2



**22 pav.** 7 YEp24-CYR1 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

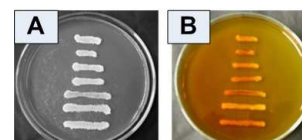


**7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup>**  
A – 55°C šoko bandymas:  
- 0 min;  
- 15 min;  
- 25 min.  
B – glikogeno dažymas

Sėjimo tvarka:  
4-2 su plazmide  
4-5 su plazmide  
4-2 be plazmidės  
4-5 be plazmidės  
7 pradinis kamienas  
7A-P192  
SP1Aras2



**23 pav.** 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

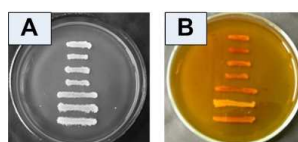


**7pXP1-BCY1**  
A – 55°C šoko bandymas:  
- 0 min;  
- 15 min;  
- 25 min;  
- 35 min.

B – glikogeno dažymas  
Sėjimo tvarka:  
10-1 su plazmide  
10-2 su plazmide  
10-1 be plazmidės  
10-2 be plazmidės  
7 pradinis kamienas  
7A-P192  
SP1Aras2

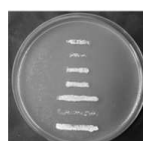


**24 pav.** 7pXP1-BCY1 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

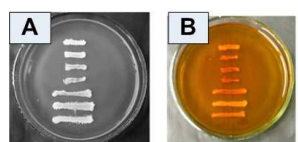


**7pXP2-TPK1**  
A – 55°C šoko bandymas:  
- 0 min;  
- 15 min;  
- 25 min;  
- 35 min.

B – glikogeno dažymas  
Sėjimo tvarka:  
2-1 su plazmide  
2-2 su plazmide  
2-1 be plazmidės  
2-2 be plazmidės  
7 pradinis kamienas  
7A-P192  
SP1Aras2



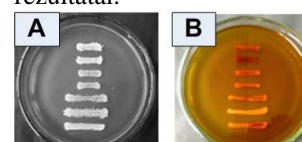
**25 pav.** 7pXP2-TPK1 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.



**7pXP3-TPK2**  
A – 55°C šoko bandymas:  
- 0 min;  
- 15 min;  
- 25 min.  
B – glikogeno dažymas

Sėjimo tvarka:  
1-1 su plazmide  
1-2 su plazmide  
1-1 be plazmidės  
1-2 be plazmidės  
7 pradinis kamienas  
7A-P192  
SP1Aras2

**26 pav.** 7pXP3-TPK2 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.



**7pXP4-TPK3**  
A – 55°C šoko bandymas:  
- 0 min;  
- 15 min;  
- 25 min.  
B – glikogeno dažymas

Sėjimo tvarka:  
2-2 su plazmide  
2-3 su plazmide  
2-2 be plazmidės  
2-3 be plazmidės  
7 pradinis kamienas  
7A-P192  
SP1Aras2

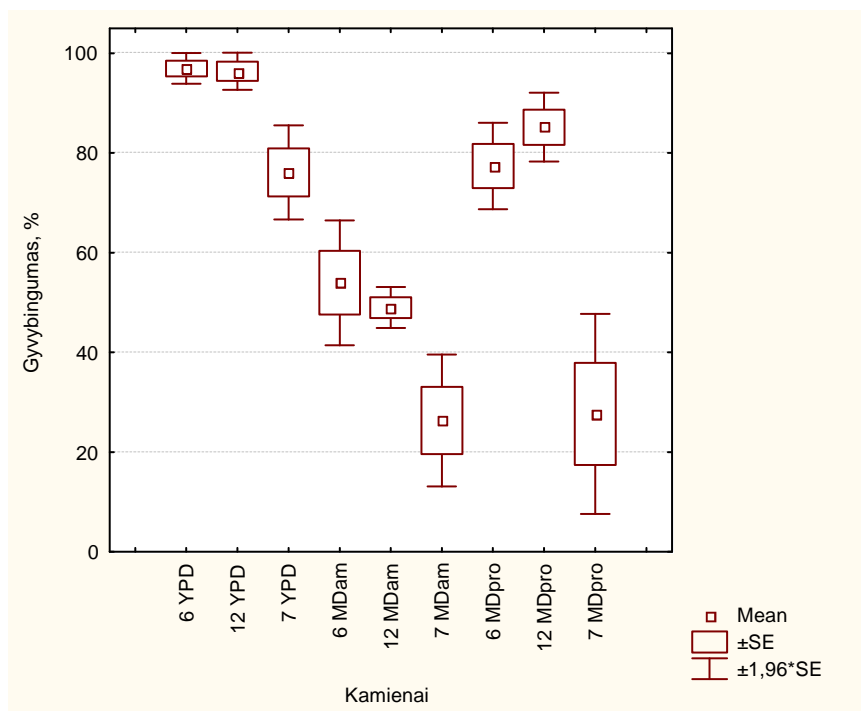
**27 pav.** 7pXP4-TPK3 transformantų glikogeno dažymo ir atsparumo karščio šokui testų rezultatai.

## 4.2. Pradinių kamienų ir jų transformantų gyvybingumo analizė.

Siekiant nustatyti pradinių (6, 12, 7) kamienų ir jų YEp24-CYR1, pXP1-BCY1, pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų fenotipinius skirtumus, buvo įvertintas šių kultūrų gyvybingumas auginant skirtingose terpėse – YPD (turtingoje) terpėje, MDam ir MDpro sintetinėse druskų terpėse, kur azoto šaltiniu naudoti amonio sulfatas arba prolinas atitinkamai. Po 5 parų mikroskopuojant buvo analizuoti propidžio jodidu nudažyti ląstelių preparatai. Gyvybingumo rodikliai išreikšti gyvų ląstelių procentu. Skirtumai buvo analizuojami taikant Statistica 6.0 programinio paketo ANOVA dispersinę analizę. Skirtumai laikomi reikšmingais jei reikšmingumo lygmuo  $p$  yra mažesnis nei 0,05.

### Pradinių kamienų (6, 12, ir 7) ląstelių gyvybingumo skirtumai.

Auginant pradinius kamienus ant agarizuotos YPD (turtingos) terpės išryškėjo tam tikri kultūrų gyvybingumo skirtumai. 6 ir 12 kamienų ląstelių gyvybingumas yra praktiškai vienodas ir siekia 96%. Tuo tarpu 7 kamienne ląstelių gyvybingumas yra ženkliai mažesnis, tik 76,11% (skirtumas yra statistiškai patikimas –  $p < 0,05$ ) (28 pav.).



28 pav. Pradinių kamienų (6, 12, ir 7) ląstelių gyvybingumas YPD, MDam ir MDpro terpėse.

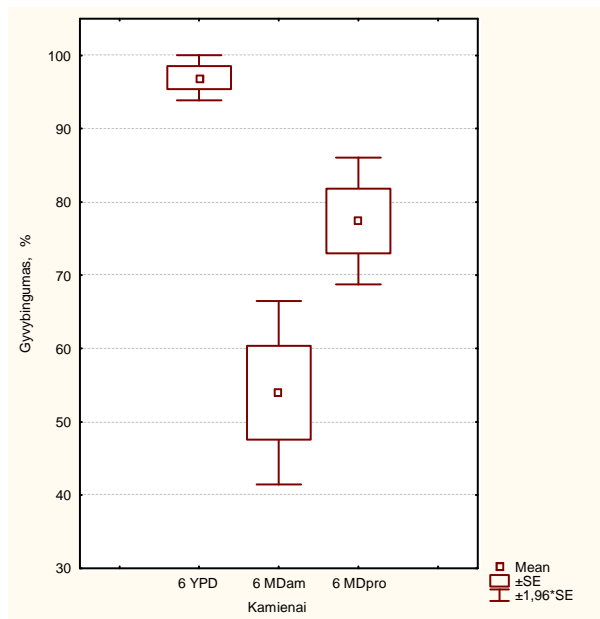
Auginant kultūras ant dviejų sintetinių MD terpių, kuriose be būtinų auktrofiniams mutantams priedų buvo vienintelis turtingas arba neturtingas azoto šaltinis - amonio sulfatas arba prolinas – pradinių kamienų ląstelių gyvybingumų skirtumai išlieka tokie pat kaip ir turtingoje YPD terpėje. Tarpkamieninių gyvybingumo skirtumus galima labai trumpai aprašyti:  $7 < (6 \approx 12)$ .

### Terpės įtaka pradinių kamienų ląstelių gyvybingumams.

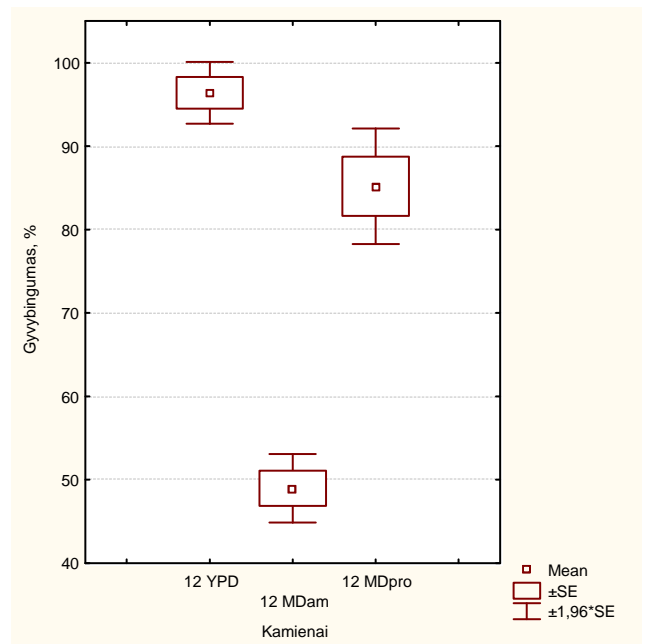
6 ir 12 kamienų atvejais pastebėti ryškūs ląstelių gyvybingumų skirtumai ( $p < 0,05$ ) – visos trys terpės smarkiai įtakoja kamienų ląstelių gyvybingumo pokyčius (29 pav. A, B). YPD terpėje stebimi didžiausi abiejų pradinių kamienų ląstelių gyvybingumo rodikliai, MDpro terpėje jei yra patikimai mažesni ir mažiausi yra MDam terpėje.

Tuo tarpu 7 kamieno ląstelių elgsena yra visiškai kitokia: YPD terpėje gyvybingumas yra ženkliai didesnis ( $p < 0,05$ ), o gyvybingumai MDpro ir MDam terpėse yra praktiškai vienodi, tačiau tesiekia 26-27% (29 pav. C).

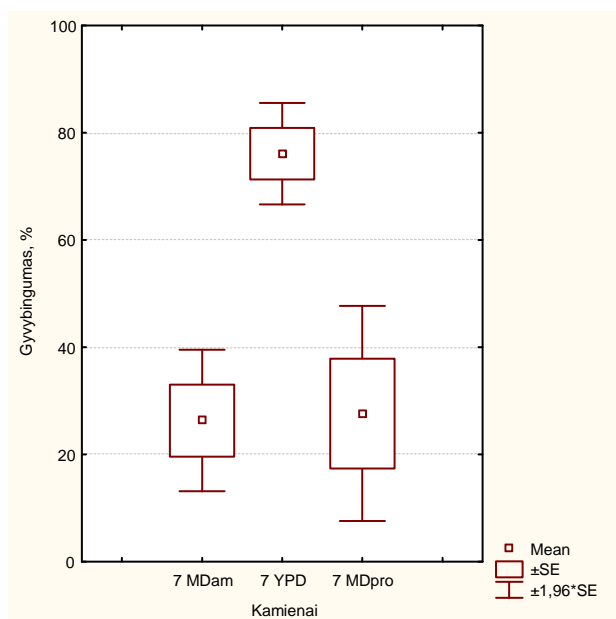
A



B



C



29 pav. Pradinių kamienų ląstelių gyvybingumas YPD, MDam ir MDpro terpėse.

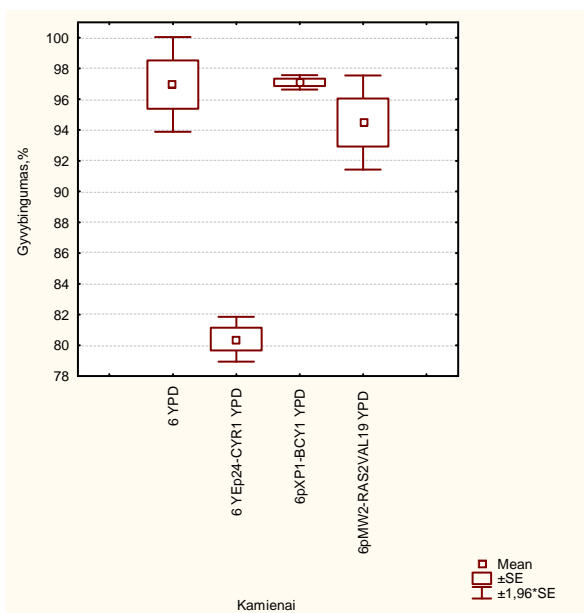
- A 6 pradinio kamieno ląstelių gyvybingumas;
- B 12 pradinio kamieno ląstelių gyvybingumas;
- C 7 pradinio kamieno ląstelių gyvybingumas.

## 4.2.1. Pradinių kamienų ir jų transformantų (įvesti *wtCYR1*, *wtBCY1*, *RAS2<sup>Val19</sup>* genai) ląstelių gyvybingumo skirtumai.

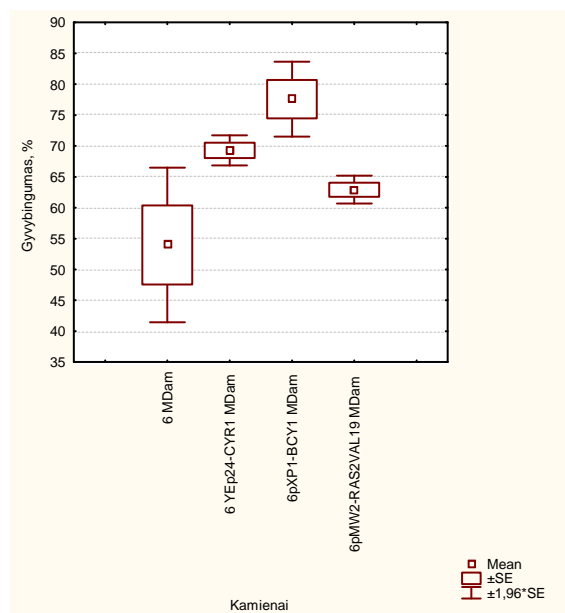
### 4.2.1.1. 6 kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.

YPD terpėje nustatyta, kad optimaliomis augimo sąlygomis (YPD terpėje) 6 YEp24-*CYR1* transformanto gyvybingumas siekiantis (80%) yra patikimai mažesnis nei pradinio kamieno ( $p < 0,05$ ). Kitų dviejų transformantų - 6pXP1-*BCY1* ir 6pMW2-*RAS2<sup>VAL19</sup>* – ląstelės pagal gyvybingumo rodiklius prilygsta pradiniam kamienui (30 pav., A).

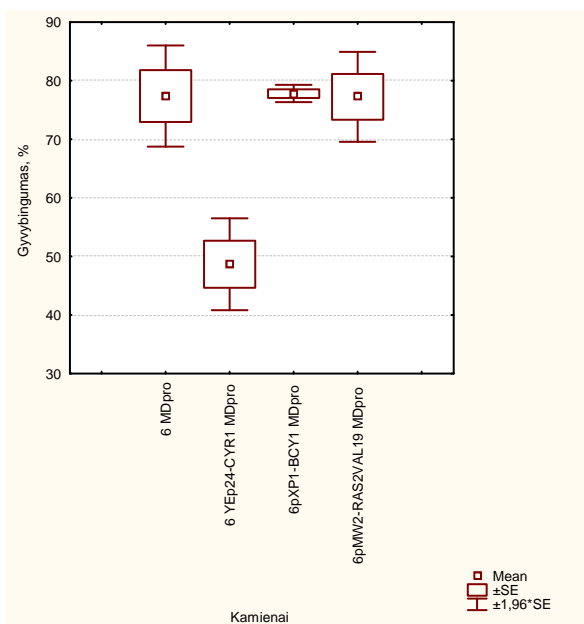
A



B



C



**30 pav.** 6 pradinio kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

- A ląstelių gyvybingumas YPD terpėje;
- B ląstelių gyvybingumas MDam terpėje;
- C ląstelių gyvybingumas MDpro terpėje.

**MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje** pradinio kamieno ir jo transformantų gyvybingumų santykis pasikeičia. Pagal ląstelių gyvybingumą išskiriamos dvi kamienų grupės.

Transformantus 6 YEp24-CYR1 bei 6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup>, kurių rodikliai nesiskiria nuo pradinio kamieno rodiklio (54%) šioje terpėje galima apjungti į mažesnio gyvybingumo grupę.

6pXP1-BCY1 transformantas atstovauja didesnio gyvybingumo grupę. Jo gyvybingumas yra ženkliai didesnis nei pradinio kamieno ( $p < 0,05$ ) ir siekia 77,5% (30 pav., B).

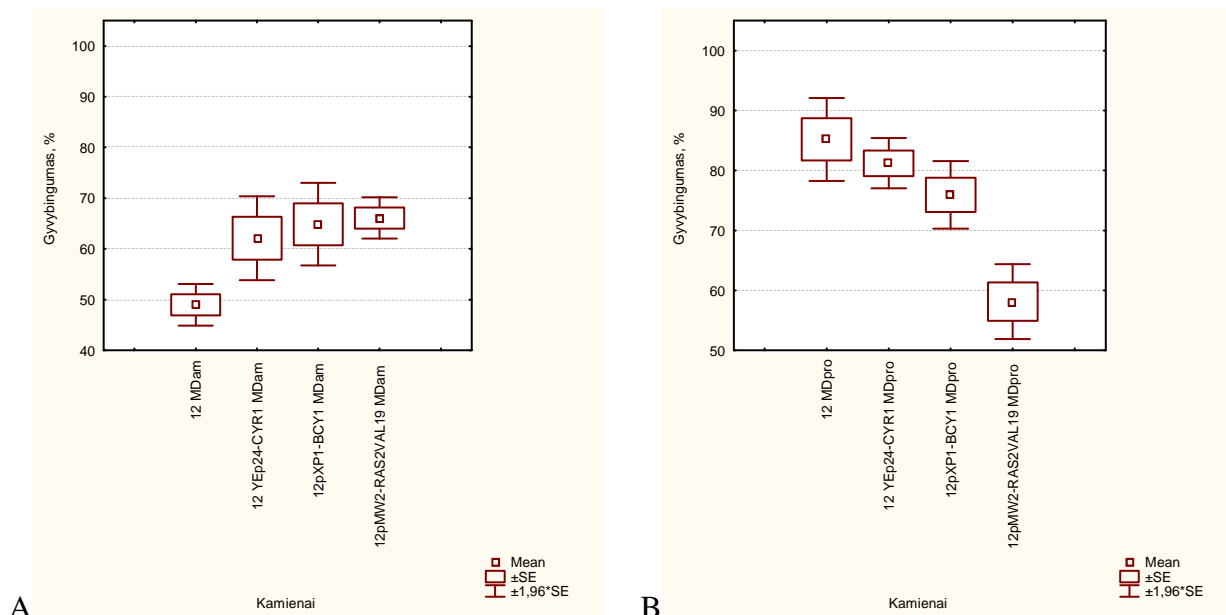
**MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje** 6 YEp24-CYR1 transformantas pasižymi mažesniu gyvybingumu (49%) pradinio kamieno atžvilgiu ( $p < 0,05$ ). Kitų transformantų bei pradinio 6 kamieno (77%) ląstelių gyvybingumų skirtumas nėra statistiškai patikimas (30 pav., C).

#### 4.2.1.2. 12 kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.

**YPD terpėje** neaptikta statistiškai patikimų 12 pradinio kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumų. Jis svyruoja 92,5-98,5% ribose.

**MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje** situacija yra visai kitokia, visi trys 12 kamieno transformantai rodo patikimai didesnę – 62-66% - ląstelių gyvybingumą nei pradiniam kamieniui ( $p < 0,05$ ). Pradinio 12 kamieno atveju po penkių parų kultyvavimo ant standžios MDam terpės lieka tik 49% gyvų ląstelių (31 pav. A).

**MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje** 12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantas pasižymi patikimai mažesniu ląstelių gyvybingumu nei pradinio kamieno 58% ( $p < 0,05$ ). Tuo tarpu 12 YEp24-CYR1 ir 12pXP1-BCY1 transformantų atveju ląstelių gyvybingumas praktiškai nesiskiria nuo pradinio kamieno. Šiose kultūruose gyvybingumas yra 75-85% ribose (31 pav., B).

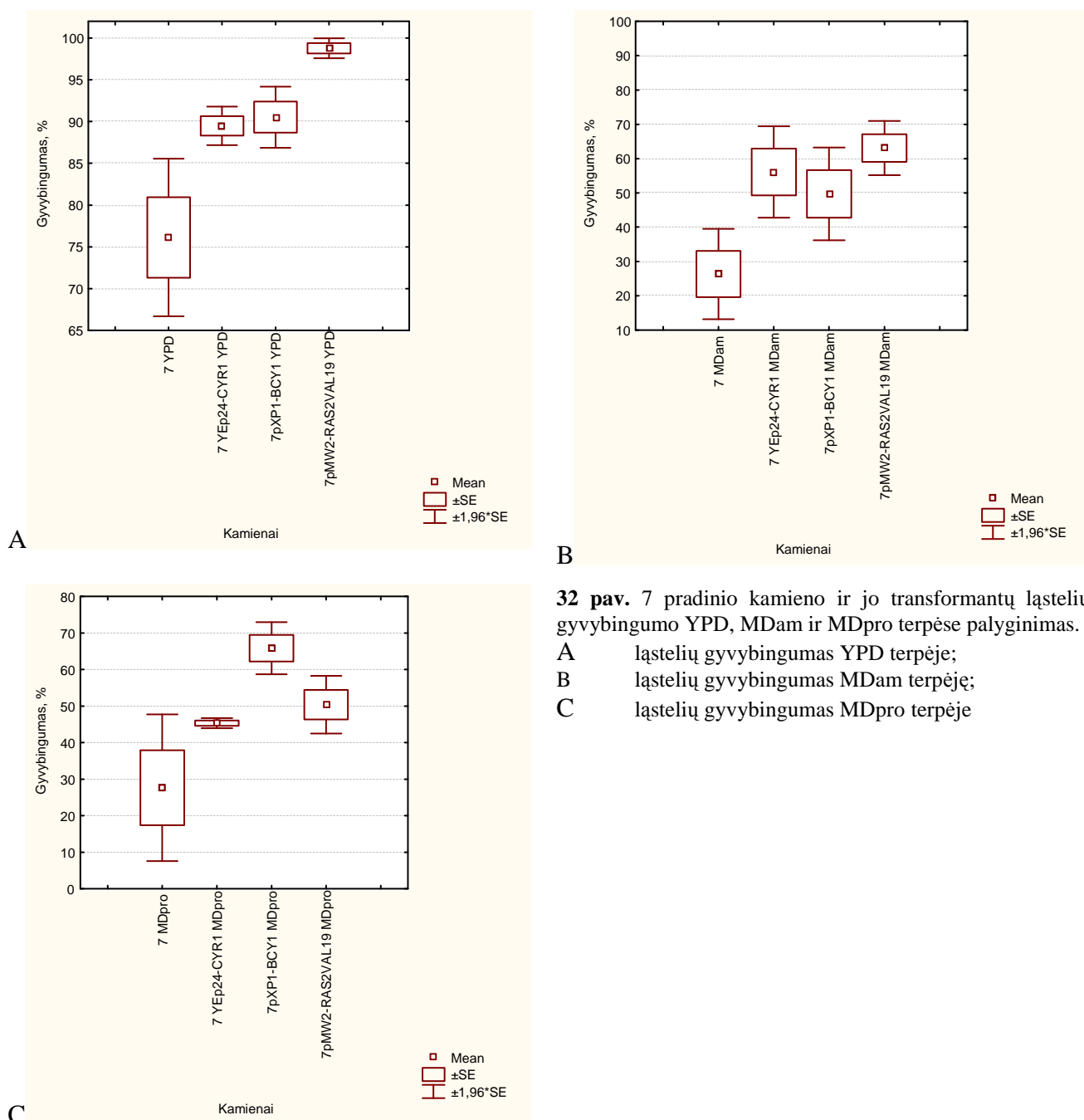


**31 pav.** 12 pradinio kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

- A ląstelių gyvybingumas MDam terpėje;
- B ląstelių gyvybingumas MDpro terpėje

### 4.2.1.3. 7 kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.

YPD terpėje pradinio 7 kamieno ląstelės pasižymi pačiu mažiausiu gyvybingumu – 76%. 7pXP1-BCY1 ir 7 YEp24-CYR1 transformantų gyvybingumas siekia 89,5–90,5%, tačiau dėl didelės pradinio kamieno rezultatų sklaidos šių transformantų ir pradinio 7 kamieno ląstelių gyvybingumo skirtumas nėra statistiškai patikimas. Tuo tarpu 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumas siekia 99% ir yra patikimai didesnis nei pradinio kamieno ( $p < 0,05$ ) (32 pav., A).



**32 pav.** 7 pradinio kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

- A ląstelių gyvybingumas YPD terpėje;
- B ląstelių gyvybingumas MDam terpėje;
- C ląstelių gyvybingumas MDpro terpėje

**MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje** išryškėja patikimi skirtumai tarp pradinio 7 kamieno ir 7 YEp24-CYR1, 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumo ( $p < 0,05$ ). Pastarųjų gyvybingumas MDam terpėje yra 56-66%. Tuo tarpu 7 pXP1-BCY1

transformanto gyvybingumas yra mažesnis nei 49,7%. Šio transformanto ir pradinio 7 kamieno ląstelių gyvybingumo skirtumas nėra statistiškai patikimas (32 pav., B).

#### MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje.

MDpro terpėje 7 pXP1-*BCY1* transformantas pasižymi patikimai didesniu (66%) nei pradinio 7 kamieno (27,66%) ląstelių gyvybingumu ( $p < 0,05$ ). Kitų transformantų ląstelių gyvybingumai statistiškai patikimai neišsiskiria pradinio kamieno atžvilgiu (32 pav., C).

### 4.2.2. YEp24-*CYR1* transformantų ląstelių gyvybingumo palyginimas.

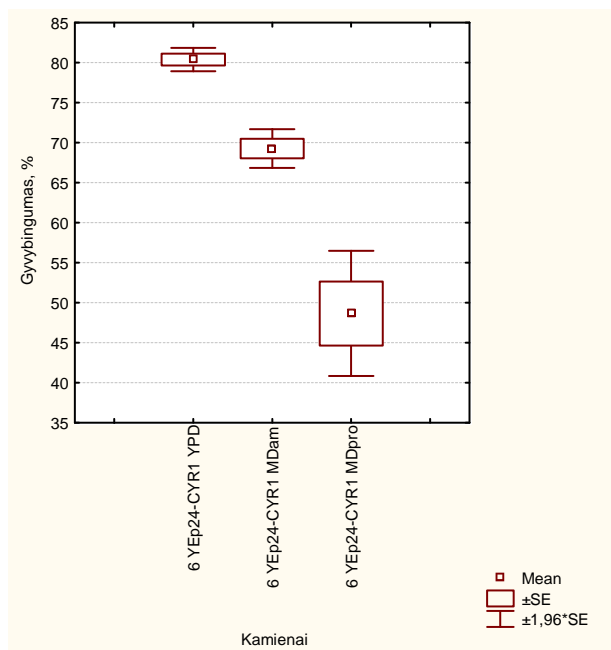
#### 6 YEp24-*CYR1* transformanto ląstelių gyvybingumas.

Palyginus 6 YEp24-*CYR1* transformanto gyvybingumą trijose augimo terpėse aptikti ženklūs, statistiškai patikimi skirtumai ( $p < 0,05$ ). 6 YEp24-*CYR1* transformanto ląstelės pasižymi dideliu 80% gyvybingumu YPD terpėje, patikimai mažesniu 69% gyvybingumu MDam, bei mažiausiu 49% gyvybingumu MDpro terpėse (33 pav., A).

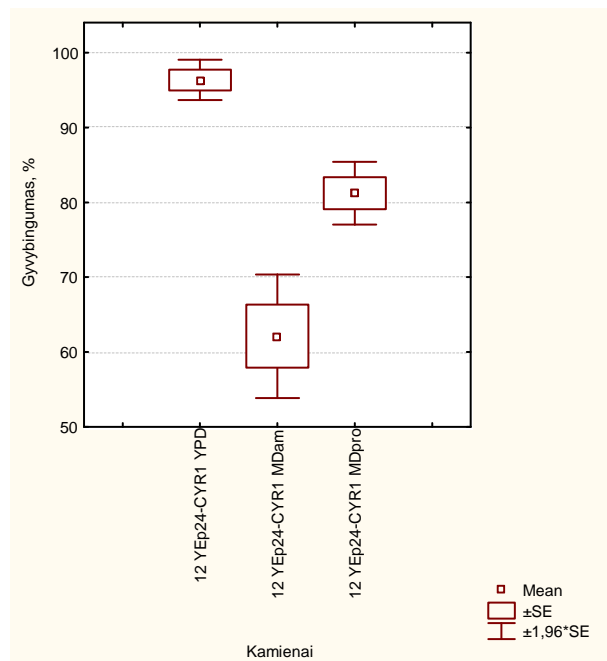
#### 12 YEp24-*CYR1* transformanto ląstelių gyvybingumas.

12 YEp24-*CYR1* transformanto ląstelių gyvybingumo pokyčiai minėtuose terpėse yra kitokie nei 6 kamieno transformantų - 12 YEp24-*CYR1* MDam terpėje gyvybingumas yra mažiausias (62%), MDpro terpėje didesnis (81%), ir pats didžiausias YPD terpėje - siekia net 96%. Gyvybingumo skirtumai yra statistiškai patikimi ( $p < 0,05$ ) (33 pav., B).

A



B



**33 pav.** 6 YEp24-*CYR1* ir 12 YEp24-*CYR1* transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

- A 6 YEp24-*CYR1* ląstelių gyvybingumas;  
 B 12 YEp24-*CYR1* ląstelių gyvybingumas.

### 7 YEp24-CYR1 transformanto ląstelių gyvybingumas.

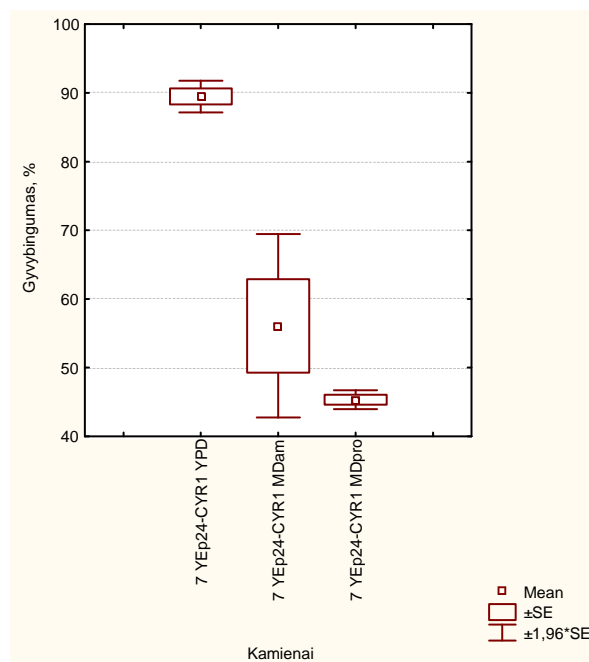
7 YEp24-CYR1 transformanto gyvybingumas taip pat pasižymėjo tendencija sumažėti MD terpėse, palyginus su YPD (89,5%). Šis gyvybingumo pokytis yra statistiškai patikimas ( $p < 0,05$ ). Gyvybingumo skirtumai tarp MDam ir MDpro terpių yra nereikšmingi (56-45%) (34 pav.).

### 4.2.3. YEp24-CYR1 transformantų ląstelių gyvybingumo tarp kamienų palyginimas.

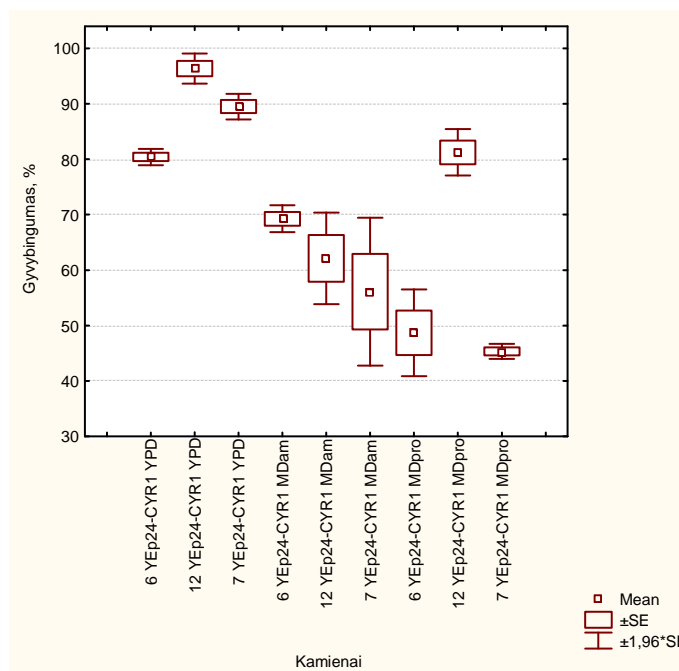
Analizuojant YEp24-CYR1 transformantų ląstelių gyvybingumą YPD terpėje, nustatyti statistiškai reikšmingi tarpkamieniniai ląstelių gyvybingumo skirtumai ( $p < 0,05$ ). 6 YEp24-CYR1 gyvybingumas YPD terpėje yra mažiausias – 80%. 7 YEp24-CYR1 užima tarpinę padėtį, šio transformanto ląstelių gyvybingumas YPD terpėje yra 89%. Didžiausiu ląstelių gyvybingumu pasižymi 12 YEp24-CYR1 transformantas, jo ląstelių gyvybingumas siekia 96% (35 pav.).

MDam terpėje visų kamienų ląstelių gyvybingumai yra vienodai sumažėję palyginus su YPD terpe, ir išsidėsto 56-70% intervale (35 pav.).

Palyginus MDpro terpėje nustatytus ląstelių gyvybingumus taipogi rasta patikimų skirtumų: 12 YEp24-CYR1 ląstelių gyvybingumas yra žymiai didesnis nei kitų transformantų, siekia net 81%. 7 YEp24-CYR1 ir 6 YEp24-CYR1 transformantų gyvybingumai praktiškai yra vienodi šioje terpėje, tarpsta 48-50% ribose (35 pav.).



34 pav. 7 YEp24-CYR1 transformanto ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas

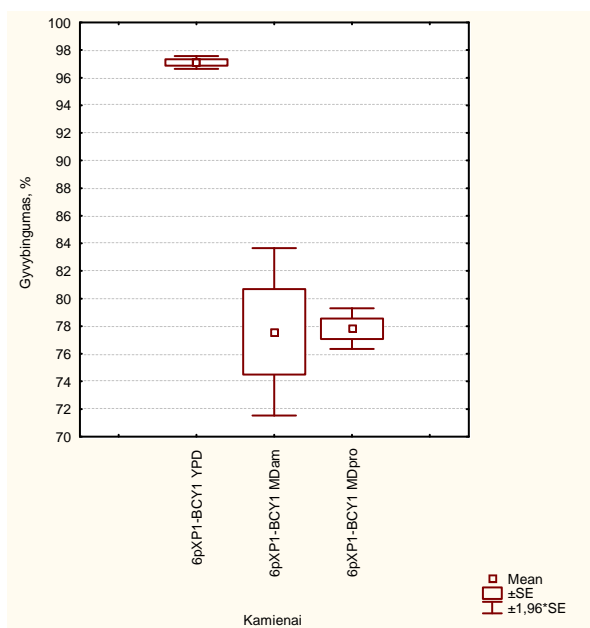


35 pav. Trijų kamienų YEp24-CYR1 transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

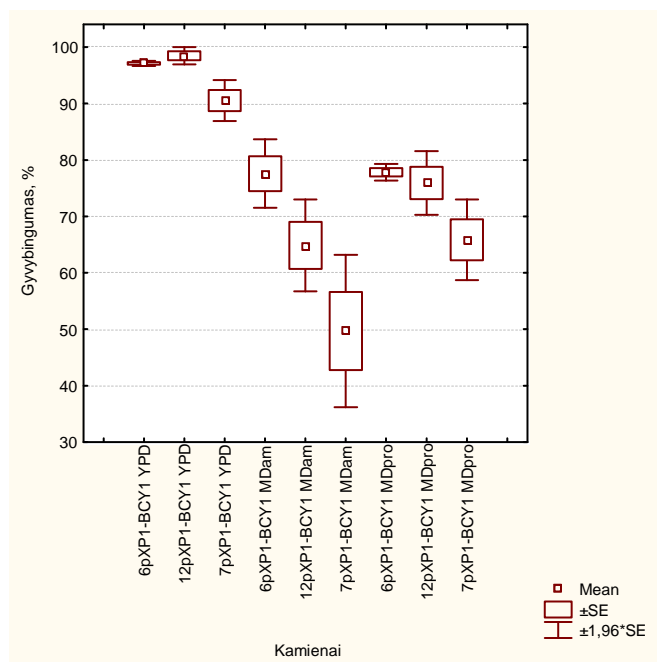


#### 4.2.4. pXP1-BCY1 transformantų ląstelių gyvybingumo palyginimas.

Skirtumai tarp YPD bei MD terpėse auginant transformantus yra ženklūs ir statistiškai patikimi ( $p < 0,05$ ), ko negalima pasakyti apie gyvybingumo rodiklių skirtumus MDam-MDpro terpėse. Visų trijų (6, 12, 7) kaminų pXP1-BCY1 transformantų ląstelių gyvybingumas YPD terpėje yra labai aukštas (90,5-98,5%) ir panašiu laipsniu sumažėjęs MDam ir MDpro terpėse (50-77,5% ir 66-78% atitinkamai). Visa tai iliustruoja 6pXP1-BCY1 transformanto gyvybingumo pokyčių trijose terpėse grafikas (36 pav.). 7pXP1-BCY1 ir 12pXP1-BCY1 transformantų atvejai kaip jau minėta yra analogiški. (37 pav.)



**36 pav.** 6pXP1-BCY1 transformanto ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.



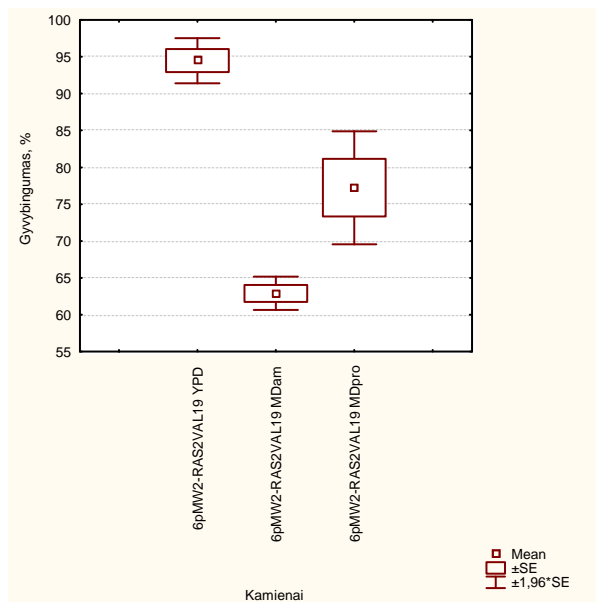
**37 pav.** Trijų kaminų pXP1-BCY1 transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

#### 4.2.5. pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumo palyginimas.

**6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumo palyginimas trijose terpėse.**

Lyginant 6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumą YPD ir MDpro terpėse, nustatytas statistiškai patikimas gyvybingumo sumažėjimas MDpro terpėje (nuo 94,5% iki 77%) ( $p < 0,05$ ), tačiau didžiausias gyvybingumo sumažėjimas palyginus su YPD terpe aptiktas MDam terpėje ( $p < 0,05$ ). Transformanto ląstelių gyvybingumas sumažėjo nuo 94,5% iki 63%.

Analogiškai palyginus transformanto ląstelių gyvybingumą MDpro ir MDam terpėse taipogi randami patikimi gyvybingumo skirtumai (MDpro - 77%, MDam - 63%) ( $p < 0,05$ ) (38 pav.).



**38 pav.** 6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

### **12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumo palyginimas trijose terpėse.**

Analizuojant ląstelių gyvybingumo skirtumus trijose augimo terpėse, aptikta, kad MDam ir MDpro terpių įtaka 12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> ląstelių gyvybingumui yra praktiškai vienoda - 66% ir 58% gyvybingumas, kai tuo tarpu YPD terpėje transformanto ląstelių gyvybingumas siekia 92,5%. Taigi patikimi skirtumai yra tik tarp YPD ir MD terpių grupės ( $p < 0,05$ ) (39 pav., A).

### **7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumo palyginimas trijose terpėse.**

7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumo pokyčiai yra praktiškai identiški 12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto gyvybingumo pokyčiams: didelis gyvybingumas YPD terpėje ir vienodai sumažėjęs MDam ir MDpro terpėje (39 pav., B).

### **4.2.6. pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumo tarp kamienų palyginimas.**

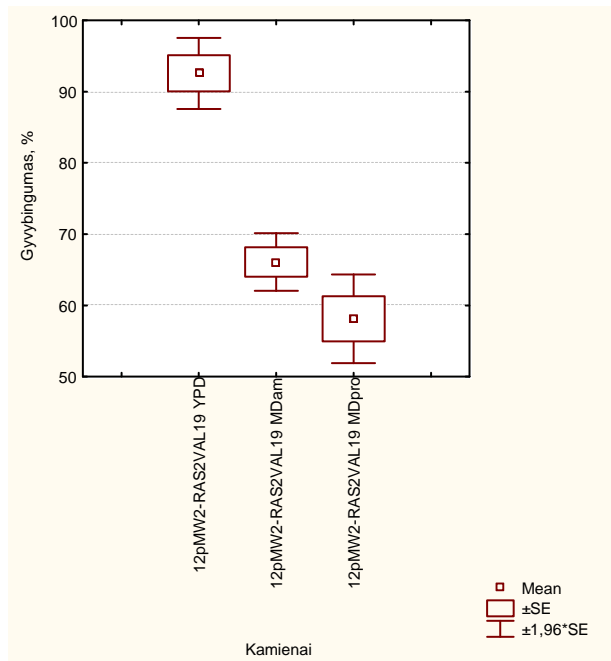
Lyginant pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumus tarp kamienų, gaunam, kad YPD terpėje visų pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumas YPD terpėje yra 81-99% ribose ir skirtumai yra nepatikimi.

MDam (azoto šaltinis – amonio sulfatas) terpėje visų kamienų pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumas yra vienodas: 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup>, 12pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> ir

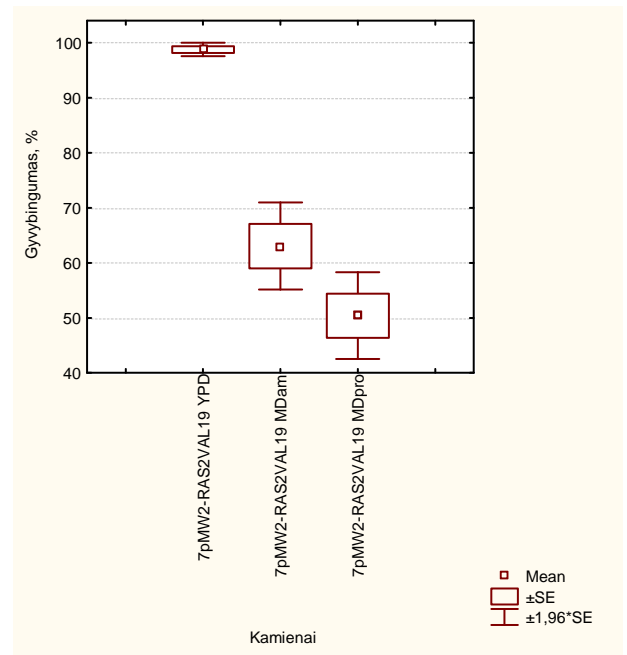
6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantai sudaro gana vienalytę grupę, kurios ląstelių gyvybingumas yra 63-66%.

MDpro terpėje (azoto šaltinis – prolinas) didžiausiu ląstelių gyvybingumu pasižymi 6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantas – 77%. Kiti transformantai sudaro mažesnio gyvybingumo grupę, kur ląstelių gyvybingumas yra 50-58,5% ribose ir pripažintas nereikšmingai įvairuojančiu grupės viduje (statistiniai skirtumai nereikšmingi -  $p < 0,05$ ) (40 pav.).

A



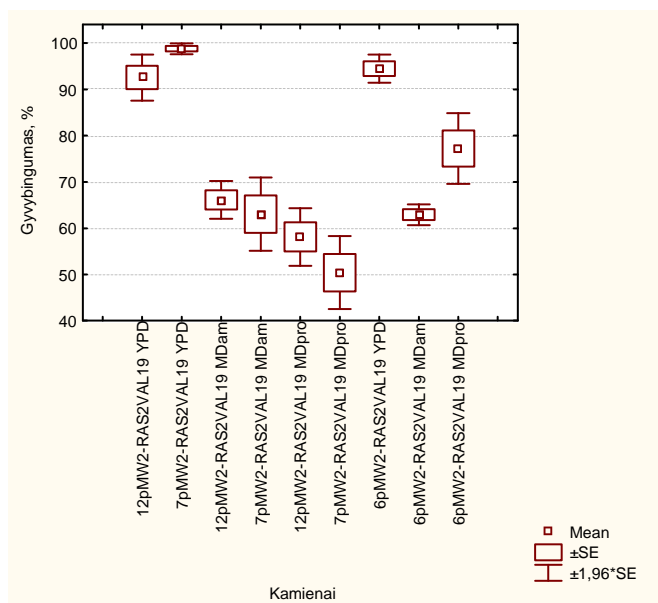
B



39 pav. pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas.

A 12 pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> ląstelių gyvybingumas;

B 7 pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> ląstelių gyvybingumas.



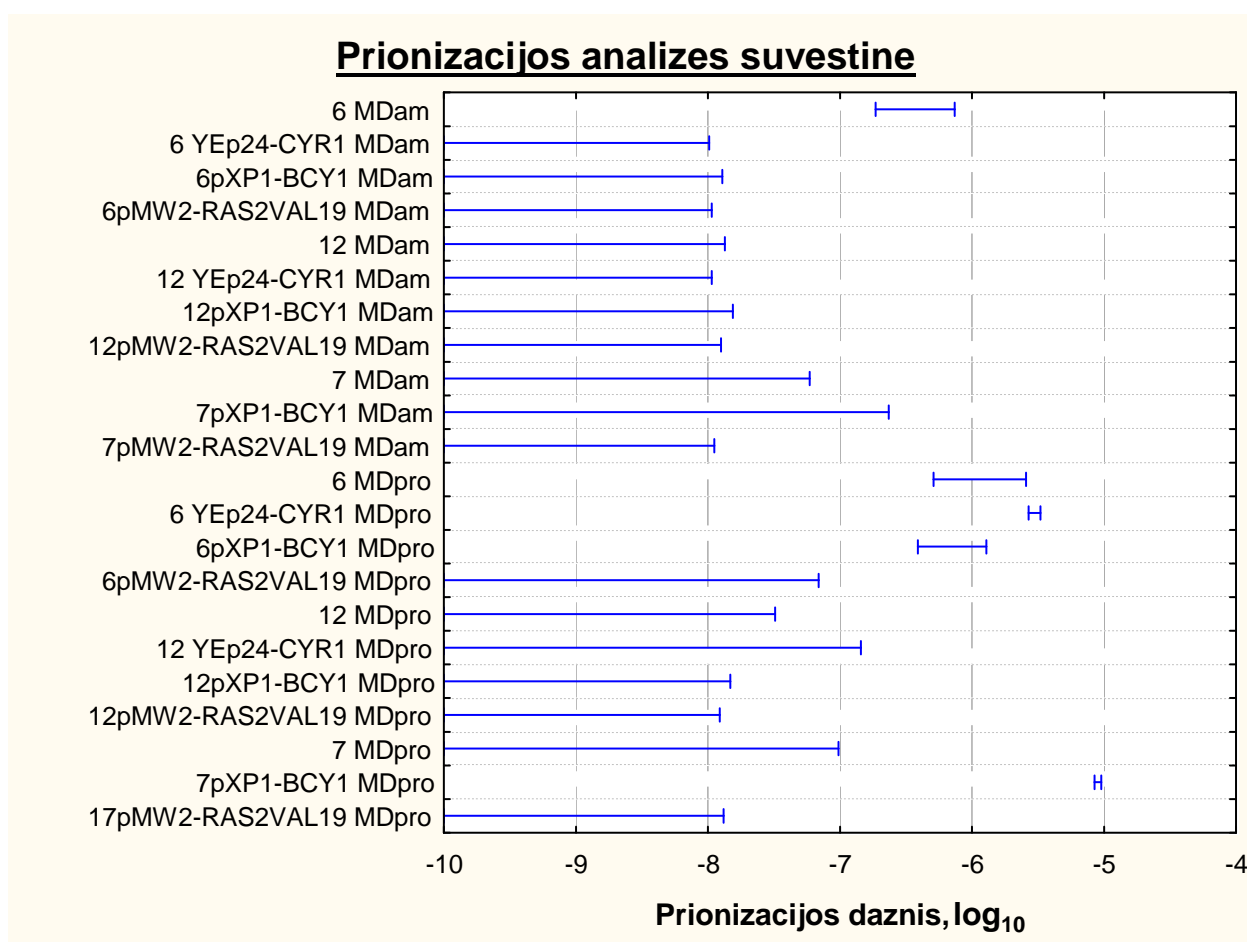
40 pav. Trijų kamienų pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumo YPD, MDam ir MDpro terpėse palyginimas

### 4.3. Prionizacijos analizė.

Siekiant įvertinti ar Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas įtakoja [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukciją buvo atlikti indukcijos bandymai su trimis giminingais kamienais ir jų transformantais (įvesti *wtCYR1*, *wtBCY1* genai bei padidinto aktyvumo *RAS2*<sup>VAL19</sup> alelis) dviejose terpėse su skirtingo turtingumo azoto šaltiniais:

- ✚ MDam – minimalioje druskų terpėje, kur azoto šaltinis yra amonio sulfatas;
- ✚ MDpro - minimalioje druskų terpėje, kur azoto šaltinis yra prolinas.

Prionizacijos dažniai apskaičiuoti atsižvelgiant į kamienų ląstelių gyvybingumo analizės duomenis ir grafiškai pavaizduoti žemiau pateiktame paveiksle.



Visais atvejais išskyrus - 6 pradinio kamieno MDam ir MDpro, bei 6 YE24-*CYR1*, 6pXP1-*BCY1*, 7pXP1-*BCY1* transformantų indukcijos MDpro terpėje atvejus – buvo nustatyta tik didžiausios prionizacijos dažnio riba, todėl mažiausia riba prilyginta 10<sup>-10</sup>. Tačiau įmanoma galimybė, kad 7 pradinio kamienas MDam ir MD pro terpėse, transformantai 7pXP1-*BCY1* MDam terpėje, bei 6pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> ir 12 YE24-*CYR1* MDpro terpėje taip pat skiriasi nuo kitų kamienų.

### **4.3.1. Pradinių kamienų (6, 12, ir 7) ląstelių prionizacijos skirtumai.**

#### **MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje.**

Analizuojant pradinių kamienų prionizaciją MDam terpėje nustatyta, kad 7 ir 12 kamienuose prionizacijos dažniai neiskiria. 7-tam kamienui prionizacijos dažnis MDam terpėje yra mažiau nei  $10^{-7,2}$ , 12-tam – mažiau nei  $10^{-7,9}$ . tuo tarpu 6 kamieno prionizacijos dažnis šioje terpėje siekia  $10^{-6,7}$ - $10^{-6,1}$  ir yra 10 kartų didesnis nei kitų dviejų kamienų.

#### **MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje.**

MDpro terpėje visų trijų pradinių kamienų prionizacijos dažniai mažai skiriasi nuo rezultatų, gautų MD am terpėje: 7 kamienui - mažiau nei  $10^{-7}$ , 12 kamienui – mažiau nei  $10^{-7,5}$ . 6 pradinio kamieno prionizacijos dažnis yra kiek didesnis, tačiau kaip ir MDam terpėje yra 10 kartų didesnis nei kitų dviejų pradinių kamienų.

### **4.3.2. Pradinių kamienų ir jų transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.**

#### **4.3.2.1. 6 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.**

#### **MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje.**

Palyginus pradinio kamieno ir jo 6 YEp24-CYRI, 6pXP1-BCYI, 6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių prionizacijos dažnius MDam terpėje nustatyta, kad visų transformantų prionizacijos dažniai nesiskiria tarpusavyje ir yra 10 kartų mažesni nei jų pradinio kamieno. Transformantų prionizacijos dažnis yra mažesnis nei  $10^{-7,6}$ .

#### **MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje.**

MDpro terpėje situacija pasikeičia. Pagal prionizacijos dažnių skirtumus galima išskirti dvi kamienų grupes. Didesnio prionizacijos dažnio grupę sudaro 6 YEp24-CYRI, 6pXP1-BCYI, ir pradinis 6 kamienas. Šios grupės prionizacijos dažniai yra  $10^{-6,5}$ - $10^{-5,5}$  ribose. Tuo tarpu 6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto prionizacijos dažnis yra mažesnis nei  $10^{-7,5}$ , tai yra 10kartų mažesnis nei pirmosios grupės atstovų.

#### **Transformantų prionizacijos dažnių skirtumai dviejose terpese.**

Lyginant transformantų prionizacijos dažnius tarp terpių, paaiškėjo, kad 6 YEp24-CYRI transformanto ląstelėse [*PSI*<sup>+</sup>] prionas beveik 1000 kartų dažniau indukuojasi MDpro terpėje ( $10^{-5,5}$  prionizacijos dažnis), nei MDam terpėje (dažnis mažesnis nei  $10^{-8}$ ).

Tokio paties pobūdžio [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos pokytis priklausomai nuo terpės pastebėtas ir 6pXP1-BCYI atveju, tik skirtumas yra kiek mažesnis (100kartų)

6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų prionizacijos dažnis MDam ir MDpro terpėje yra vienodas.

#### **4.3.2.2. 12 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.**

##### **MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje.**

12 kamieno ir jo transformantų prionizacijos dažniai šioje terpėje nesiskiria tarpusavyje ir yra mažesni nei  $10^{-7,8}$ .

##### **MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje.**

Šioje terpėje 12 YEp24-CYRI transformantas kiek dažniau prionizuojasi nei pradinis 12 kamienas ir kiti transformantai, bet šis skirtumas nėra patikimas ir apibendrinant galima tvirtinti kad 12 kamieno ir jo transformantų prionizacijos dažniai MDpro terpėje yra mažesni nei  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$ .

##### **Transformantų prionizacijos dažnių skirtumai dviejose terpėse.**

Lyginant tų pačių transformantų prionizacijos dažniu MDam ir MDpro terpėje, patikimų skirtumų nėra.

#### **4.3.2.3. 7 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.**

##### **MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje.**

Šioje terpėje nustatyti pradinio 7 kamieno ir jo transformantų prionizacijos dažniai nesiskiria. Apibendrinant gautus eksperimentinius duomenis gaunam, kad 7 kamieno ir jo transformantų prionizacijos dažniai yra mažesni nei  $10^{-8}$ - $10^{-6,6}$ .

##### **MDpro (azoto šaltinis – prolinas) terpėje.**

Vertinant 7 kamieno ir jo transformantų prionizaciją MD pro terpėje nustatyti labai dideli 7pXP1-BCYI ir kitų kamienu skirtumai. 7pXP1-BCYI transformanto prionizacijos dažnis yra lygus  $10^{-5}$  ir bent 100 kartų viršija pradinio 7 kamieno bei 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto prionizacijos dažnius. Jų prionizacijos dažniai yra mažesni nei  $10^{-7,8}$  -  $10^{-7}$ .

##### **Transformantų prionizacijos dažnių skirtumai dviejose terpėse.**

Palyginus 7pXP1-BCYI transformanto [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnį dviejose terpėse, pastebėta, kad MDpro terpėje prionizacijos dažnis yra 10-100 kartų didesnis nei MDam terpėje. 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> kamieno atveju [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos pokyčių priklausomai nuo azoto šaltinio terpėje nepastebėta.

#### **4.3.3. Tarpkamieninis transformantų prionizacijos dažnių palyginimas.**

Skirtumai tarp YEp24-CYRI transformantų išaiškėja tik MDpro terpėje: 6 YEp24-CYRI prionizacijos dažnis ( $10^{-5,6}$ ) yra ženkliai didesnis nei 12 YEp24-CYRI atveju (mažiau nei  $10^{-6,8}$ ). MDam terpėje abiejų transformantų prionizacijos dažnis yra vienodai sumažėjęs iki  $10^{-8}$ .

Palyginus pXP1-BCYI transformantų prionizacijos dažnius, skirtumai pastebėti tik MDpro terpėje - 7pXP1-BCYI prionizacijos dažnis yra didžiausias tarp trijų kamienu -  $10^{-5}$ ,

6pXP1-*BCY1* prionizacijos dažnis yra daugiau nei 10 kartų mažesnis  $10^{-6,4}$  -  $10^{-5,9}$ , o 12pXP1-*BCY1* transformantas rodo patį mažiausią prionizacijos dažnį -  $10^{-7,8}$ . MDam terpėje pXP1-*BCY1* transformantų prionizacijos dažniai yra mažesni nei  $10^{-7,8}$ - $10^{-6,6}$ , o skirtumai nėra reikšmingi.

pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> transformantų prionizacijos dažnis nesiskiria nei terpėse, nei tarp kamienų, ir yra mažesnis nei  $10^{-8}$ .

## 5. Rezultatų aptarimas

### Glikogeno kaupimo ir atsparumo karščio šokui analizės apibendrinimas.

Atsižvelgiant į glikogeno kaupimo bei jautrumo karščio šokui pokyčius, galima padaryti išvadą, kad: *wtCYR1*, *wtTPK1*, *wtTPK2* genų, bei dominantinio kostitutyviai aktyvaus alelio *RAS2<sup>VAL19</sup>* raiška didina Ras/PKA kelio aktyvumą 6 kamieno ląstelėse, tuo tarpu *wtTPK3* ir *wtBCY1* genų įvedimas jo neįtakoja.

Atlikti bandymai rodo, kad *wtCYR1* bei *wtTPK1* genų raiška padidina Ras/PKA kelio aktyvumą 12 kamieno ląstelėse, tuo tarpu *RAS2<sup>VAL19</sup>*, *wtBCY1*, *wtTPK2* bei *wtTPK3* genų įvedimas į kamieno ląsteles jo neveikia.

7 kamieno testavimo rezultatai kaip ir 12 kamieno atveju, rodo, kad *wtCYR1* bei *wtTPK1* genų raiška padidina Ras/PKA kelio aktyvumą 7 kamieno ląstelėse, tuo tarpu *RAS2<sup>VAL19</sup>*, *wtBCY1*, *wtTPK2* bei *wtTPK3* genų įvedimas neturi įtakos glikogeno kaupimui ir atsparumui karščio šokui neparodo.

Atliktų bandymų glikogeno kaupimo bei atsparumo karščio šokui testų rezultatai rodo, kad:

- ✚ *wtCYR1* ir *wtTPK1* genų raiška didina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą visų tiriamųjų kamienų ląstelėse;
- ✚ *wtTPK2* geno ir aktyvaus alelio *RAS2<sup>VAL19</sup>* raiška taip pat didina signalinio kelio aktyvumą, tačiau tik 6 kamieno ląstelėse, tuo tarpu 12 ir 7 kamienuose šių genų ekspresija įtakos neturi;
- ✚ *wtTPK3* ir *wtBCY1* genų įvedimas neįtakoja Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo visų trijų recipientinių kamienų ląstelėse

### Transformantų gyvybingumo analizės apibendrinimas.

#### Pradinių kamienų (6, 12, ir 7) ląstelių gyvybingumo skirtumai.

Buvo įvertintas YEp24-*CYR1*, 6pXP1-*BCY1*, pMW2-*RAS2<sup>VAL19</sup>* transformantų ir pradinių kamienų ląstelių gyvybingumas YPD ir dviejose, besiskiriančiose azoto šaltiniu terpėse. Visose trijose terpėse išlieka pradinių kamienų skirtumai: 6 ir 12 kamienų ląstelių gyvybingumai tarpusavyje nesiskiria, tuo tarpu 7 kamieno yra mažesnis. Taip pat reikia pažymėti, kad 6 ir 12 kamienų ląstelių gyvybingumas yra smarkiai įtakojamas azoto šaltinio prigimties terpėje – MD terpėje su turtingu azoto šaltiniu ląstelių gyvybingumas yra sumažėjęs lyginant su šių kamienų ląstelių gyvybingumu MDpro terpėje (azoto šaltinis - prolinas).



## **6, 12, ir 7 kamienų ir jų transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumai.**

YPD terpėje 6 pradinio kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumai yra panašūs, išimtį sudaro tik 6 YEp24-*CYRI* transformantas – jo ląstelių gyvybingumas yra mažesnis nei pradiniam kamienai. Tuo tarpu MDam terpėje pradinio 6 kamieno atžvilgiu išsiskiria 6pXP1-*BCYI* transformanto ląstelių gyvybingumas, kuris yra ženkliai didesnis nei pradiniam kamienai. MDpro terpėje vėl gi atsikartoja YPD terpėje stebima situacija – pradinio kamieno atžvilgiu išsiskiria tik 6 YEp24-*CYRI* transformantas.

YPD terpėje neaptikta statistiškai patikimų 12 pradinio kamieno ir jo transformantų ląstelių gyvybingumo skirtumų. MDam terpėje visi trys 12 kamieno transformantai (12 YEp24-*CYRI*, 12pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup>, 12 pXP1-*BCYI*) pasižymi didesniu gyvybingumu nei pradinis 12 kamienas. MDpro terpėje beveik visų transformantų ląstelių gyvybingumas praktiškai nesiskiria nuo pradinio kamieno. 12pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> transformantas sudaro išimtį: jo ląstelių gyvybingumas yra mažesnis nei pradinio kamieno.

YPD terpėje tik 7pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelių gyvybingumas yra didesnis nei pradinio kamieno. MDam terpėje 7YEp24-*CYRI*, 7pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelių gyvybingumas yra didesnis už pradinio 7 kamieno. MDpro terpėje tik 7 pXP1-*BCYI* transformanto gyvybingumas yra ženkliai didesnis palyginus su pradinio kamienai, kiti transformantai gyvybingumu nesiskiria nuo pradinio 7 kamieno ląstelių gyvybingumo.

### **Terpės įtaka *wtCYRI*, *wtBCYI*, *RAS2*<sup>VAL19</sup> raiškai.**

6 YEp24-*CYRI* transformanto ląstelių gyvybingumas yra ženkliai įtakojamas terpės sudėties: didžiausias gyvybingumas stebimas YPD terpėje, mažesnis MDam terpėje, ir pats mažiausias parodytas MDpro terpėje su neturtingu azoto šaltiniu.

12 kamienai terpės azoto šaltinio įtaka *wtCYRI* geno raiškai yra atvirkščiai: didžiausias 12 YEp24-*CYRI* transformanto gyvybingumas stebimas YPD terpėje, mažesnis MDpro, o minimalus - MDam terpėje.

7 kamienai *wtCYRI* raiška neprikauo nuo azoto šaltinio terpėje – gyvybingumai MDam ir MDpro terpėse nesiskiria.

Visų trijų kamienų atvejais nustatyta, kad azoto šaltinio terpėje prigimtis neįtakoja *wtBCYI* geno raiškos, MDam ir MDpro terpėse transformantų gyvybingumai nesiskiria atitinkamo kamieno ribose.

Pastebėta, kad *RAS2*<sup>VAL19</sup> alelio raiška 6 kamienai yra kitokio pobūdžio nei *wtCYRI* – MDpro terpėje (neturtingas azoto šaltinis) stebimas didesnis ląstelių gyvybingumas, nei MDam.

7 ir 12 kamienų atvejais *RAS2*<sup>VAL19</sup> alelio įtaka ląstelių gyvybingumui yra praktiškai vienoda abiejose MD terpėse – gyvybingumai nesiskiria. Galima išvada: azoto šaltinio prigimtis neįtakoja *RAS2*<sup>VAL19</sup> raiškos šių kamienų ląstelėse.

## **Prionų indukcijos dažnio analizės apibendrinimas.**

### **Prionų indukcijos dažnio skirtumai pradinių (6, 12, ir 7) kamienų ląstelėse.**

7 ir 12 kamienuose prionizacijos dažniai MDam terpėje neiskiria, yra mažesni nei  $10^{-7,2}$  -  $10^{-7,9}$ . 6 kamieno prionizacijos dažnis šioje terpėje yra 10 kartų didesnis, siekia  $10^{-6,7}$ - $10^{-6,1}$  MDpro terpėje visų trijų pradinių kamienų prionizacijos dažniai neiskiria nuo kamienų prionizacijos dažnių MDam terpėje. Tai rodo, kad terpės azoto šaltinio prigimtis pradinių kamienų prionizacijos dažnių neįtakoja.

### **6 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai**

MDam terpėje nustatyta, kad visų transformantų prionizacijos dažniai nesiskiria tarpusavyje ir yra 10 kartų mažesni nei jų pradinio kamieno. Transformantų prionizacijos dažnis yra mažesnis nei  $10^{-7,6}$ .

Lyginant su MDam terpėje gautais rezultatais 6 YEp24-CYRI, 6pXP1-BCYI transformanto ląstelėse prionų indukcijos dažniai MDpro terpėje yra didesni ir siekia pradinio 6 kamieno prionizacijos dažnį (prionizacijos dažniai yra  $10^{-6,5}$ - $10^{-5,5}$  ribose). 6 YEp24-CYRI transformanto ląstelėse [ $PSI^+$ ] prionas beveik 1000 kartų dažniau indukuojasi MDpro terpėje ( $10^{-5,5}$  prionizacijos dažnis), nei MDam terpėje (dažnis mažesnis nei  $10^{-8}$ ). Tokio paties pobūdžio [ $PSI^+$ ] priono indukcijos pokytis priklausomai nuo terpės pastebėtas ir 6pXP1-BCYI atveju, tik skirtumas yra kiek mažesnis (100kartų)

6pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformantų prionizacijos dažnis MDam ir MDpro terpėje yra vienodas.

### **12 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.**

MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje pradinio 12 kamieno ir jo transformantų priono indukcijos dažniai nesiskiria tarpusavyje ir yra mažesni nei  $10^{-7,8}$ . Lyginant transformantų prionų indukcijos dažnius MDam ir MDpro terpėje, skirtumų neaptikta. 12 kamieno ir jo transformantų prionizacijos dažniai MDpro terpėje yra mažesni nei  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$ .

### **7 kamieno ir jo transformantų ląstelių prionizacijos skirtumai.**

MDam (azoto šaltinis - amonio sulfatas) terpėje pradinio 7 kamieno ir jo transformantų prionizacijos dažniai nesiskiria, ir yra mažesni nei  $10^{-8}$ - $10^{-6,6}$ .

MDpro terpėje. 7pXP1-BCYI transformanto ląstelėse prionų indukcijos dažnis bent 100 kartų viršija pradinio 7 kamieno prionizacijos dažnį ir yra lygus  $10^{-5}$ . Tai parodo, kad 7pXP1-BCYI transformanto [ $PSI^+$ ] priono indukcijos dažnis MDpro terpėje yra 10-100 kartų didesnis nei MDam terpėje. 7 kamieno ir 7pMW2-RAS2<sup>VAL19</sup> transformanto ląstelėse prionų indukcijos dažniai MDpro terpėje yra mažesni nei  $10^{-7,8}$  -  $10^{-7}$ .

### **Tarpkameninis transformantų prionizacijos dažnių palyginimas.**

Reikia pažymėti, kad MDam terpėje transformantų prionizacijos dažniai yra maži ir patikimai tarpusavyje neiskiria. Skirtumai išryškėja tik MDpro terpėje. YEp24-*CYRI* transformantų atveju žymų prionizacijos dažnio padidėjimą MDpro terpėje rodo tik 6 YEp24-*CYRI* transformantas (10 kartų). pXP1-*BCYI* transformantų atveju MDpro terpėje 7pXP1-*BCYI* prionizacijos dažnis yra didžiausias ( $10^{-5}$ ), 6pXP1-*BCYI* prionizacijos dažnis yra daugiau nei 10 kartų mažesnis, o 12pXP1-*BCYI* transformanto prionizacijos dažnis lieka toks pat kaip MDam terpėje  $10^{-7,8}$ .

pMW2-*RAS2*<sup>VAL19</sup> transformantų ląstelėse prionų indukcijos dažnis nesiskiria nei terpėse, nei tarp kamienų, ir yra mažesnis nei  $10^{-8}$ .

## 6. Išvados

1. Atlikta analizė parodė, kad Ras/PKA signalinio kelio komponentai *CYR1* ir *TPK1* įtakoja pradiniuose kamienuose 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 12- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 7- $\alpha$ '1-NB13 esančių mutacijų raišką – didina Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą.
2. Ląstelių gyvybingumo analizė YPD ir dviejose, besiskiriančiose azoto šaltiniu (amonio sulfatas arba prolinas), terpėse parodė, kad turtingas azoto šaltinis mažina 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 12- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup> kamienu ląstelių gyvybingumą.
3. Nustatyta, kad azoto šaltinis gali moduluoti *CYR1*, *BCY1*, *TPK1* ir *Ras2<sup>Val19</sup>* genų raišką ląstelių gyvybingumo lygmenyje. Moduliacijos raiška priklauso nuo pradiniuose kamienuose esančių mutacijų.
4. Nustatyta, kad azoto šaltinis neįtakoja [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnio 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup> kamieno ląstelėse.
5. Parodyta, kad terpėje esant turtingam azoto šaltiniui 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup> kamieno ląstelėse padidinta *CYR1*, *BCY1* ir *Ras2<sup>Val19</sup>* genų raiška sumažina [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnį.
6. Parodyta, kad terpėje esant neturtingam azoto šaltiniui 7- $\alpha$ '1-NB13 kamieno ląstelėse padidinta *BCY1* geno raiška padidina [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnį.
7. Gauti rezultatai rodo, kad [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnis gali priklausyti nuo Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo.

Darbą atliko:

Ana Vilkova

Darbo vadovas:

Prof. dr. D. Čitavičius

## SANTRAUKA

[*URE3*] priono indukcija priklauso nuo Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo. Galima šio kelio įtaka [*PSI*<sup>+</sup>] priono formavimuisi gali būti numanoma iš natyvaus Sup35 baltymo struktūros. Šio baltymo struktūroje yra nustatytos kelios menamos PKA fosforilinimo vietos. Siekiant patikrinti šią galimybę buvo atliktas trijų, Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu besiskiriančių, izogeninių kamienų – 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 12- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 7- $\alpha$ '1-NB13 - [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnio įvertinimas. Rezultatai parodė, kad terpėje esant turtingam azoto šaltiniui 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup> kamieno ląstelėse padidinta *CYR1*, *BCY1* ir *Ras2*<sup>Val19</sup> genų raiška sumažina [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnį. Tuo tarpu, terpėje esant neturtingam azoto šaltiniui 7- $\alpha$ '1-NB13 kamieno ląstelėse padidinta *BCY1* geno raiška padidina [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnį. Todėl galima daryti išvadą, kad [*PSI*<sup>+</sup>] priono indukcijos dažnis gali priklausyti nuo Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo.

## SUMMARY

[*URE3*] prion induction depends on the activity of the Ras/PKA signal transduction pathway. Possible influence of this pathway on the formation of [*PSI*<sup>+</sup>] prion could be predicted from the structure of the native Sup35 protein. Several possible phosphorylation sites are known in the structure of this protein. In order to check this possibility analysis of prion induction frequency of three isogenic mutant strains – 6- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 12- $\alpha$ '1-NB13<sup>-</sup>, 7- $\alpha$ '1-NB13 – different in the activity of the Ras/PKA signal transduction pathway, was performed. Results showed that in the presence of rich nitrogen source in cells of the strain 6- $\alpha$ '1-NB13 the increased expression of *CYR1*, *BCY1* and *Ras2*<sup>Val19</sup> genes decreases the frequency of [*PSI*<sup>+</sup>] prion induction. Instead, in the presence of poor nitrogen source in cells of the strain 7- $\alpha$ '1-NB13 the increased expression of *BCY1* gene increases the frequency of [*PSI*<sup>+</sup>] prion induction. So, it is possible to make a conclusion that the frequency of induction of the [*PSI*<sup>+</sup>] prion depends on the activity of the Ras/PKA signal transduction pathway.

## Literatūros sąrašas

1. Andrianova V. M. and Inge-Vechtomov S. G. (1988) Katalog Petergofskoi geneticheskoi kollektzii drozhzei *Saccharomyces cerevisiae* (A Catalogue of Peterhof genetic Collection of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*), *Leningrad: Len. Gos.Univ.* 4-52.
2. Bousset L., Melki R. (2002). Similar and divergent features in mammalian and yeast prions. *Microbes and Infection* 4: 461-469.
3. Bradley M. E., Edskes H. K., Hong J. Y., Wickner R. B., and Liebman S. W. (2002). Interactions among prions and prions „strains“ in yeast. *PNAS* 99: 16392-16399.
4. Caughey B. (2001) Prion protein interconversions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356: 197-202.
5. Chernoff Y. O., Galkin A., Lewitin E., Chernova T., Newnam G. P., and Belenkiy S. M. (2000). Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein. *Mol. Microbiology* 35: 865-876.
6. Chernoff Y. O. (2001). Mutation processes at the protein level: Is Lamarck back? *Mutation Research* 488: 39-64.
7. Chernoff Y. O., Inge-Vechtomov S. G., Derkach I. L., Ptyushkina M. V., Turanina O. V., Dagkesamanskaya A. R., Ter-Avanesyan M. D. (1992). Dosage-dependent translational suppression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8: 489-499.
8. Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-vectomov S. G., Liebman S. W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI<sup>+</sup>]. *Science* 268: 880-884.
9. Chien, P., Weissman, J. S., and DePace A. H. (2004). Emerging principles of conformation based prion inheritance. *Annu. Rev. Biochem.* 73:617-656.
10. Citavicius D. (2001) Genetic control of cell growth and development in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: I. Phenotypic selection of mutants among strains of the Peterhof genetic collection. *Genetika* 37: 762-769.
11. Colombo S., Ma P., Cauwenberg L., Winderickx J., Crauwels M., Teunissen A., Nauwelaers D., de Winde J. H., Gorwa M. F., Colavizza D., Thevelein J. M. (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 3326-3341.
12. Cox B. (1965). [PSI], a cytoplasmic suppressor of super-suppression in yeast. *Heredity* 20:505-21.

13. Craig E., Ziegelhoffer N., Nelson J., Laloraya S., Halladay J. (1995). Complex multigene family of functionally distinct Hsp70s of yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 60:441-449.
14. De Pace A. H., Santoso A., Hillner P., Weissman J. S. (1998). A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion. *Cell* 93: 1241-52.
15. Derkatch I. L., Bradley M. E., Masse S. V., Zadorsky, S. P., Polozkov G. V., Inge-Vechtomov S. G., and Liebman S. W. (2000). Dependence and independence of [PSI<sup>+</sup>] and [PIN<sup>+</sup>]: a two-prion system in yeast? *EMBO J* 19:1942-1952.
16. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. (1996). Genesis and variability of [psi] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 1375-86.
17. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P, Chernoff Y. O., Liebman S. W. (1997). Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [Psi<sup>+</sup>] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 147(2):507-19.
18. Edskes H. K. (2001). Protein-based inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*: [URE3] as a prion form of the nitrogen regulatory protein Ure2. *Res. Microbiol.* 152: 605-612.
19. Edskes H. K. and Wickner R. B. (2000) A protein required for prion generation: [URE3] induction requires the Ras-regulated Mks1 protein. *PNAS USA* 97: 6625-6629.
20. Edskes H. K., Gray V. G., Wickner R. B. (1999). The [URE3] prion is an aggregated form of Ure2p that can be cured by overexpression of Ure2p fragments. *PNAS USA* 96:1498-1503.
21. Elbe R. (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques*. 13: 1.
22. Fernandez-Bellot E., and Cullin C. (2001). The protein – only theory and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the prions and the propagons. *CMLS, CELL. Mol. Life Sci.* 58: 1857-1878.
23. Francois J. and Parrou J. L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 125-145.
24. Glover J. R., Kowal A. S., Shirmer E. C., Patino M. M., Liu J. J., Lindquist S. (1997). Self-seeded fibers formed by Sup35p, the protein determinant [PSI<sup>+</sup>], a heritable prion-like factor of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Cell* 89: 811-19.
25. Glover J. R., Lindquist S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 94: 73-82.



26. Igual J. C. And Estruch F. (2000). Signalling stress in yeast. *Food technol. Biotechnol.* 38(4):263-276
27. Jung G, Jones G, Wegrzyn RD, Masison DC. (2000). A role for cytosolic hsp70 in yeast [Psi+] prion propagation and [Psi+] as a cellular stress. *Genetics* 156(2):559-70.
28. Kido M., Shima F., Satoh T., Asato T., Kariya, K. (2002). Critical Function of The Ras-associating Domain as a Primary Ras-Binding Site for Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Adenylyl Cyclase. *Journal of Biol. Chem.* 5: 3117-3123
29. Kikuchi Y., Shimatake H., Kikuchi A. (1988). A yeast gene required for G1-to-S transition encodes a protein containing an A- kinase target site and GTPase domain. *EMBO J.* 7: 1175-1182.
30. Kushnirov VV, Kryndushkin DS, Boguta M, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD.(2000). Chaperones that cure yeast artificial [Psi+] and their prion-specific effects. *Curr Biol.* 10(22):1443-1446.
31. Lacroute F. (1971) Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J. Bacteriol.* 106: 519–522.
32. Lindquist S. L. (2000) But yeast prion offers clues about evolution. *Nature* 408: 17-18.
33. Liu J. J., Sondheimer N., Lindquist S. L. (2002). Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI+]. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99 (Suppl. 4): 16446-16453.
34. Ma P., Versele M., Gorwa M-F., Colombo S., Lemaire K., Bossi D., Loiez A.. and Thevelein J.M. (2000) A baker's yeast mutant (*fil1*) with a specific, partially inactivating mutation in adenylylase maintains a high stress resistance during active fermentation and growth. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2(4): 521-530.
35. Masison D.C., Maddelein M. and Wickner R. (1997). The prion model for [URE3] of yeast: Spontaneous generation and requirements for propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12503-12508.
36. Michelitch M. D., Wessman J. S. (2000). A census of glutamine/asparagine-rich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11910-11915.
37. Moriyama H., Edskes H. K., and Wickner R. B. (2000). [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8916-8922.
38. Osherovich L. Z., and Weissman J. S. (2001). Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI+] prion. *Cell* 106:183-194.

39. Portela, P., Zaremberg V. and Moreno S. (2001). Evaluation of in vivo activation of protein kinase A under non-dissociable conditions through the overexpression of wild-type and mutant regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 147:1149-1159.
40. Robertson L. S. and Fink G. R. (1998). The tree yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13783-13787.
41. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, second edition, published by Cold Spring Harbour Laboratory Press.
42. Schwimmer C. and Masison D. C. (2002). Antagonistic interactions between yeast [PSI+] and [URE3] prions and curing of [URE3] by Hsp70 protein chaperone Ssa1p but not by Ssa2p. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3590-3598.
43. Serio T. R. and Lindquist S. L. (1999) [PSI+]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 661-703.
44. Serio T. R., Lindquist S. L. (2000). Protein – only inheritance in yeast: something to get [PSI+] – ched about. – *Cell Biol.* 10: 98-105.
45. Sherman F., Fink, G. R., Hicks J. B. (1986) Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
46. Sherman M. Y. (2004) Yeast prions: Protein agregation is not enough. *PLoS Biol* 2: 0436-0439.
47. Shin D. Y., Matsumoto K., Iida H., Uno I., Ishikawa T. (1987) Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 7: 244-250.
48. Skuzheski J. M., Nichols L. M., Gesteland R. F., Atkins, J. F. (1991) The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. *J Mol Biol* 218: 365-373.
49. Smith A., Ward M. P., Garrett S. (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17: 3556-3564.
50. Sondheimer N., iand Lindquist S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell* 5: 163-172.
51. Ter-Avanesyanyan M. D., Paushkin S. V., Kushnirov V. V., Kochneva-Pervuchova N. V. (1998). Molekuliarnyje mehanizmy “belkovej” nasledstvennosti: priony drozdej. Molekuliarnaja biologija, tom 32: 32-42 p.
52. Ter-Avanesyanyan M.D., Kushnirov V. V. (1999). Priony : infekcionnyje belki s geneticheskimi svoistvami. Biochimija, tom 64, 1638-1647 p.

53. Thevelein I. M. (1994). Signal Transduction in Yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.
54. Thevelein J. M. (1991) fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 5: 1301-1307.
55. Thevelein J. M. (1992) The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 62: 109-130.
56. Thevelein J. M. and de Winde J. H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-*pr*tein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33: 904-918.
57. True H. L., Lindquist S. L. (2000) A yeast prion provides a mechanism for genetic and phenotypic diversity. *Nature* 407: 477-483.
58. Uptain S. M., Lindquist S. (2002). Prions as Protein-Based Genetics Elements. –*Rev. Microbiol.* 56: 703-41.
59. Vanhalewyn M., Dumortier F., Debast G., Colombo S., Ma P., Winderickx J., Van Dijck P., and Thevelein J. M. (1999). A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, *Cyr1*<sup>K1876M</sup>, specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signaling and not the basal cAMP level. *Mol. Microbiol.* 33(2): 363-376.
60. Wickner R. B. (1994) [URE3] as an altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566-569.
61. Wickner R. B., Taylor K. L., Edskes H. K., Maddelein M.-L., Moriyama H., Roberts B. T. (1999). Prions in *Saccharomyces cerevisiae* and *Podospora spp.* : protein-based inheritance. *Microbiol and Mol. Biol. Rev.* 63: 844-861.

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju savo kolegoms ir darbo vadovui Prof. dr. D. Čitavičiui už palaikymą ir visokeriopą pagalbą.