

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
Botanikos ir genetikos katedra

Vidmantas Karalius

**Mielių *Saccharomyces cerevisiae* preprotoksino geno raiškos galimybių
augaluose tyrimas**

Magistro darbas

Darbo vadovai:

Doc. Dr. Juozas Prosevičius

Dr. Vytautas Melvydas

2009, Vilnius

VIDMANTAS KARALIUS

SANTRAUKA

**Mielių *Saccharomyces cerevisiae* preprotoksino geno raiškos galimybių
augaluose tyrimas**

Šio darbo tikslas buvo patikrinti ar įmanoma padidinti mielių *Saccharomyces cerevisiae* K2 tipo kilerinio preprotoksino geno raiškos galimybes augaluose, naudojant konstitutyvų žiedinio kopūsto mozaikos viruso CaMV 35S promotorių. Šiam tikslui pasiekti buvo atlikta: neonkogeninių agrobakterijų (*Agrobacterium tumefaciens*) kamieno konjugantų atrinkimas, turinčių augalų transformacijos vektorių pART27-KillK2 su mielių K2 tipo kilerinį preprotoksina koduojančiu genu; atlikta paprastojo tabako (*Nicotiana tabacum* L.) transformacija minėtų agrobakterijų pagalba bei selektyvi *Nicotiana tabacum* L. transgeninio kaliaus atranka. Po sėkmingos *Agrobacterium tumefaciens* konjugacijos su *E.coli* kamieniu, turinčiu kilerinę plazmidę pART27-KillK2 ir sėkmingos modelinio augalo *N.tabacum* agrobakterinės lapų eksplantų transformacijos, buvo taikomas PGR metodas bei vykdomas kileriškumo patikrinimas. PGR ir DNR elektroforezės pagalba buvo nustatyta, kad *KillK2* genas yra įsiterpęs į augalo genomą ir vyksta silpna šio geno raiška, tačiau žiedinio kopūsto mozaikos viruso CaMV 35S promotoriaus prieš šį geną aptikti nepavyko.

Ankstesnių tyrimų metu buvo manoma, kad K2 tipo kilerinio preprotoksino geno informacija transformuotuose augaluose su vektoriumi pGA482-KillK2 yra realizuojama kuomet šio geno transkripcija tiesiogiai reguliuojama mielių alkoholdehidrogenazės ADH1 promotoriumi, tačiau šio darbo metu, atliekant tyrimus, buvo parodyta, kad promotorius ADH1 taip pat nėra prisijungęs prie geno *KillK2* pradžios. Gali būti, kad promotoriai ADH1 ir CaMV35S transformuotuose augaluose yra nutolę nuo *KillK2* geno pradžios arba jų funkciją atlieka kiti reguliaciniai elementai, kurių ekspresijos reguliacija nėra efektyvi. Tikriausiai dėl šios priežasties su skirtingais vektoriais (pGA482-KillK2 ir pART27-KillK2) transformuotuose augaluose, stebima nedidelė ir vienoda kilerinio toksino ekspresija. Taip pat, K2 tipo toksino aktyvumui gali turėti įtakos baltymų brendimo specifiškumas augalo ląstelėse, nes kilerinio preprotoksino brendimas augalų (*N.tabacum*) ir mielių (*S.cerevisiae*) ląstelėse labai skiriasi dėl specifinių proteazių buvimo ar nebuvimo ir glikozilinimo. Net ir sėkmingos transformacijos atveju nėra žinoma kaip augalo ląstelės reaguoja į toksino susidarymą jų viduje ar po sekrecijos. Kadangi augalo ląstelės labai skiriasi nuo mielių ląstelių, todėl kilerinio toksino funkcionavimas jose gali turėti nemažos įtakos, pavyzdžiui jų gyvybingumui. Norint pilnai atsakyti į šiuos klausimus, ateityje planuojama atlikti transformuotų augalų detalesnę analizę.

SUMMARY

Investigation of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Preprotoxin Gene Expression Possibilities in Plants

The aim of this work was to verify the possibility to increase expression of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), K2 type killer preprotoxin in plants, using constitutive cauliflower mosaic virus CaMV 35S promoter. In order to achieve it, the following was done: selection of nononcogenic strain of agrobacterium (*Agrobacterium tumefaciens*) with plant transformation vector pART27-KillK2, containing K2 type killer preprotoxin gene; transformation of plain tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with mentioned agrobacteria; selection of *Nicotiana tabacum* L. transgenic callus. Following the success of the *Agrobacterium tumefaciens* conjugation with *E.coli* strain (containing killer plasmid pART27-KillK2) and successful transformation of model *N.tabacum* plant with *A.tumefaciens*, there was used the PCR method to check out the killer effect of it. PCR and DNA electrophoresis showed that *KillK2* gene is incorporated into plant genome and there is weak expression of this gene. However there was not found the promoter of cauliflower mosaic virus CaMV 35S upstream this gene.

In the previous studies, it was considered that the expression of mentioned transformed gene exist only when the transcription of it is directly regulated by alcoholdehydrogenase ADH1 promoter. However after investigation it was shown that promoter ADH1 isn't connected to beginning of gene *KillK2*. There is the possibility that both ADH1 and CaMV35S promoters are remote from the beginning of *KillK2* gene, or the initiation is done by other regulators, which are ineffective. Probably for this reason in transformed plants (with both pGA482-KillK2 and pART-KillK2 vectors) there was observed weak and constitutive expression of preprotoxin. Also the specifics of protein maturation in plants may have had effect. Killer preprotoxin maturation in plants (*N.tabacum*) and yeasts (*S.cerevisiae*) is very different because of absence or existence of specific proteases or glycosylation. Even after successful case of transformation it is not known how the cells of plant react to such toxin formation inside or secretion outside cell. Since plant cells are very different from the yeast cells, the functionality of killer toxin may have significant influence, such as their viability. In order to fully answer these questions, there is planned more detailed study of transformed plants in the future.