

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**Gamtos mokslų fakultetas**  
**Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra**

**Viktorija Jefimovaitė**

**[PSI<sup>+</sup>] priono įtaka mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės sienelės  
sandarai**

Baigiamasis magistro darbas

Mokslinis vadovas:  
Prof. habil. dr. (hp) D. Čitavičius

Vilnius 2007

# Turinys

|                                                                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Santrumpos                                                                                                                                                     | 4         |
| Įvadas                                                                                                                                                         | 5         |
| <b>2. Literatūros apžvalga</b>                                                                                                                                 | <b>6</b>  |
| 2.1. Genetinės prionų ypatybės                                                                                                                                 | 6         |
| 2.2. Prioninių darinių susidarymas <i>in vivo</i>                                                                                                              | 7         |
| 2.3. Mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> prioninės sistemos                                                                                                 | 8         |
| 2.3.1. Prionų silpnų ir stiprių variantų ypatybės                                                                                                              | 9         |
| 2.3.2. Prionų tarpusavio sąveikos                                                                                                                              | 11        |
| 2.4. Prioninių Sup35 baltymo fibrilių formavimosi mechanizmas                                                                                                  | 12        |
| 2.4.1. Šaperoninio baltymo Hsp104 įtaka prionizacijai                                                                                                          | 13        |
| 2.4.2. Šaperono Hsp70 ir prioninių pradmenų replikacijos sąsaja                                                                                                | 15        |
| 2.4.3. Aktino citoskeleto vaidmuo Sup35 baltymo agregacijoje                                                                                                   | 16        |
| 2.5. Kilerinės mielių sistemos                                                                                                                                 | 18        |
| 2.6. [ <i>KIL-d</i> ] veiksnio reikšmė mielių genų ekspresijos reguliacijoje                                                                                   | 19        |
| 2.7. Kilerinių mielių imuniškumo toksinams strategija                                                                                                          | 21        |
| <b>3. Medžiagos ir metodai</b>                                                                                                                                 | <b>24</b> |
| 3.1. Medžiagos                                                                                                                                                 | 24        |
| 3.1.1. Reagentai                                                                                                                                               | 24        |
| 3.1.2. Mielių kamienai                                                                                                                                         | 24        |
| 3.1.3. Terpės                                                                                                                                                  | 25        |
| 3.2. Metodai                                                                                                                                                   | 26        |
| 3.2.1. [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] priono indukcija mielių ląstelių kultūroje                                                                                  | 26        |
| 3.2.2. Mielių auginimas tiriant prionų įtaką jų augimui                                                                                                        | 26        |
| 3.2.3. Kilerinio aktyvumo nustatymas                                                                                                                           | 26        |
| <b>4. Rezultatai</b>                                                                                                                                           | <b>28</b> |
| 4.1. R <sup>+</sup> N ir 43/1 kamienų prioninių klonų augimo skystoje MD terpėje analizė                                                                       | 28        |
| 4.2. Eliminantių, gautų iš R <sup>+</sup> N ir 43/1 kamienų [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] variantų augimo skystoje MD terpėje analizė | 29        |
| 4.3. Kilerinių toksinų poveikis R <sup>+</sup> N ir 43/1 tėviniams kamienams                                                                                   | 30        |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.4. Kilerinių toksinų poveikis 43/1 kamieno [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantams ir jų eliminantams</b>           | <b>31</b> |
| <b>4.5. Kilerinių toksinų poveikis R<sup>+</sup>N kamieno [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantams ir jų eliminantams</b> | <b>32</b> |
| <b>4.6. K2 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir43/1 kamienams</b>                                                                | <b>34</b> |
| <b>4.7. K28 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir43/1 kamienams</b>                                                               | <b>36</b> |
| <b>4.8. K1 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir43/1 kamienams</b>                                                                | <b>38</b> |
| <b>4.9. Kilerinių toksinų poveikis R<sup>+</sup>N ir43/1 kamienams</b>                                                         | <b>40</b> |
| <b>Rezultatų aptarimas</b>                                                                                                     | <b>43</b> |
| <b>Išvados</b>                                                                                                                 | <b>44</b> |
| <b>Santrauka</b>                                                                                                               | <b>45</b> |
| <b>Summary</b>                                                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>Literatūros sąrašas</b>                                                                                                     | <b>48</b> |

## Santrumpos

DNR-dezoksiribonukleorūgštis;  
RNR-ribnukleorūgštis;  
SDS-sodos dodecilsulfatas;  
GuHCl-guanidino hidrochloridas;  
Asn-asparaginas  
Gln-gliutaminas;  
Pro-prolinas;  
Hsp (heat shock protein)-karščio šoko baltymas;  
PoliQ-poligliutaminas;  
dsRNR (double stranded RNR)-dvigrandė RNR;  
ATP-adenozintrifosfatas;  
CaCl<sub>2</sub>-kalcio chloridas;  
NaCl-natrio chloridas;  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-kalio hidrofosfatas;  
MgSO<sub>4</sub>-magnio sulfatas;  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-amonio sulfatas;  
C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>-citrinų rūgštis;  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-natrio hidrofosfatas;  
YPD-turtinga terpė;  
MD-minimali druskų terpė;  
MB-metileno (methylen-based) terpė;  
OT-optinis tankis.

## Ivadas

Pažymėtina, kad prioniniams baltymams būdingas ne tik infektyvus plitimas tarpląsteliniu būdu, bet ir sudėtingos sąveikos su kitais specifiniais baltymais. Konkreti sąveika su ląstelės baltymais parodyta tik keliais atvejais. Vienas tokių baltymų yra Sla1, dalyvaujantis ląstelės aktino citoskeleto vidumolekulinėje struktūrizacijoje ir įtakojantis prioninio būvio palaikymą ląstelėje.

Prionų sąveikos ypatumai su Sla1 baltymu yra mažai tirti. Paskutiniųjų tyrimų duomenimis, mielių aktino citoskeletas vaidina svarbų vaidmenį prioninių darinių formavimosi procese. Citoskeletiniai aktino komponentai, sąveikauja su nesugrupuotais prioniniais baltymais. Manoma, kad prioninių baltymų ir kitų ląstelės baltyminių, tame tarpe ir citoskeletinių komponentų sąveikos gali įtakoti tokius svarbius ląstelės gyvybinei veiklai procesus. Vienu iš tokių procesų gali būti atsparumas kilerinių kamienų išskiriamiems toksinams.

Šiame darbe mielių prionų sąveikai su kitais ląstelės baltymais tirti pirmą kartą buvo panaudotos kilerinės ir prioninės mielių sistemos, siekiant išsiaiškinti galimą prionų sąveiką su baltymais, sąlygojančiais kilerinio toksino veikimą.

### Darbo tikslas:

Nustatyti  $[PSI^+]$  priono įtaką K1, K2 ir K28 kilerinių toksinų veikimui mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių atžvilgiu.

### Darbo uždaviniai:

1. Izogeninių  $[PIN^+][PSI^+]$  ir  $[PIN^+][psi^-]$  kamienų išskyrimas.
2. Izogeninių stiprių ir silpnų  $[PIN^+][PSI^+]$  kamienų išskyrimas.
3. K1, K2 ir K28 kilerinių toksinų poveikio izogeninėms  $[PIN^+][PSI^+]$  ir  $[PIN^+][psi^-]$  formoms analizė.

## 2. Literatūros apžvalga

### 2.1. Genetinės prionų ypatybės

Remiantis pagrindine molekulinės biologijos dogma, genetinė medžiaga organizmuose pernešama nuo DNR į RNR, o nuo pastarosios - baltymui. Įprastai baltymas nepasižymi savybe genetinę informaciją perduoti naujai sintetiniams baltymams. Tačiau atradus prioninius baltymus buvo nustatyta, kad pastarieji baltymai gali ne tik išsaugoti informaciją apie savo struktūros konformacinius pokyčius, bet ir perduoti ją naujai sintetiniams baltymams, kuriuose pakinta tretinė struktūra.

Prionams būdingos sąsajos su daugeliu fenotipų, paveldimų ne pagal Mendelio dėsnis. Prioniniai baltymai taip pat sąlygoja daugelį neurodegeneratyvinių ligų (žmonėms - Kuru, Creutzfeld-Jacob sindromai, fatalinė šeimyninė insomnija; avims - scrapie; galvijams - spongiforminė encefalopatija). Šių susirgimų pasekmės apima neuronų irimą ir amiloidinių sankaupų atsiradimą smegenų audinyje. Amiloidinės sankaupos yra tvarkingos struktūros prionizuotų baltyminių fibrilių agregatai, galintys infekuoti sveiką organizmą ir normalius ląstelės baltymus (ląstelinius prioninio baltymo analogus) paversti prionizuotais (Caughey, 2001).

Prionizuotis gebantys baltymai atrasti ir mielėse. Mielių ląstelėse egzistuojantys epigenetiniai elementai - prionai - organizmui suteikia papildomo adaptacinio lankstumo, ko pasekoje ląstelė efektyviau reguliuoja skirtingus gyvybinius procesus esant tam pačiam fenotipui (Bousset ir kt., 2001; Chernoff, 2001).

Remiantis bendrąja priono koncepcija (Wickner, 1994), prionai yra pakitusios antrinės ir tretinės struktūros baltymai, praradę savo normalią funkciją ir gebantys indukuoti naujai sintetinamų baltymų prionizaciją. Prioniniams baltymams būdingos sekančios savybės:

1) **Paveldėjimas ne Mendelinio būdu.** Prioniniai baltymai ir kiti mielių infekciniai veiksniai yra pernešami ląstelių kryžminimosi metu ir neatitinka Mendelinio paveldėjimo dėsnio.

2) **Grižtamas išgydymas.** Prionizuotą mielių kamieną paveikus baltyminiais ar cheminiais veiksniais, sąlygojančiais šaperonų ekspresijos lygio pokyčius, prionas gali būti pašalinamas iš ląstelių populiacijos, tačiau pakartotinai indukuojasi  $10^{-6}$  dažniu. Dėl šios priežasties mielių ląstelių populiacijoje pakartotinai indukuojasi tam tikras prionizuotų ląstelių skaičius, tačiau prarasti DNR ar RNR elementai savaime neatsiranda.

3) **Priono indukcija dėl padidėjusios baltymo ekspresijos.** Padidėjus tam tikro baltymo sintezei ląstelėje, padidėja prionizacijos tikimybė, nes padaugėja ląstelių-taikinių kiekis. Prioniniai dariniai formuojasi ir plinta infekuodami sveikas ląsteles.

4) **Fenotipinė priono ir jo geno mutacijų sąsaja.** Recesyvinės mutacijos sąlygotam fenotipui būdinga homologinė sąsaja su prionizacijos sąlygotu fenotipu. Pirmuoju atveju baltymo sintezė nevyksta arba susintetintas baltymas yra neaktyvus, o antruoju atveju baltymas praranda savo funkciją dėl prionizacijos (Wickner, 1994). Sup35 baltymo funkcijos praradimas lemia translacijos terminacijos netikslumus stop kodonų vietose, o Ure2 baltymo funkcijos praradimo pasekoje sutrinka nuo azoto priklausanti ureidosukcinato represija.

Taigi, mielėse produkuojami prioniniai elementai yra dominuojantys, paveldimi ne pagal Mendelio dėsnius ir pernešami citodukcijos metu. Mielėse geriausiai ištirti yra [*PSI*<sup>+</sup>] ir [*URE3*] prionai, kurie yra susiję atitinkamai su Sup35 ir Ure2 baltymų konformaciniais pokyčiais. Sup35 baltymas yra translacijos terminacijos faktorius, o Ure2 baltymo funkcija yra susijusi su azoto kataboline represija.

Tarp mielių ir žinduolių prionų egzistuoja eilė panašumų (atsparumas proteazių poveikiui; amiloidinių fibrilių formavimas) ir skirtumų (genetiniai prionų kriterijai; prionų aktyvumas ląstelėje; prionų virtimas infektyviomis formomis ir kt.), todėl reikalinga išsamesnė mielių prioninių sistemų analizė naujai ištiriamų mielių prionų svarbai jų veikimo modelių tyrimuose nustatyti.

## 2.2. Prioninių darinių susidarymas *in vivo*

Mielėse *Saccharomyces cerevisiae* buvo nustatyti citoplazmiškai paveldimi epigenetiniai veiksniai [*PSI*<sup>+</sup>] ir [*PIN*<sup>+</sup>], kurie yra atitinkamai Sup35 ir Rnq1 baltymų prioninės formos. Šie prioniniai baltymai turi daug gliutamino ir asparagino (Gln/Asn). Sup35 yra pagrindinis prionizaciją sąlygojantis baltymas, tirpioje neprionizuotoje formoje veikiantis translacijos terminacijos metu. Prionizuotose ląstelėse translacijos terminacijos proceso sutrikimai sąlygoja prioninių baltymų ir jų agregatų susidarymą. Nustatyta, kad [*PSI*<sup>+</sup>] ląstelėse Sup35 baltymai yra susitelkę į didelius polimerinius darinius, netirpstančius sodos dodecilsulfato (SDS) tirpale. Kiekvieną iš tokių Sup35 baltymo polimerų sudaro 9-50 monomerų (Bagriantsev S. ir kt., 2004).

Tikslus Rnq1 baltymo veikimas ląstelės prionizacijos metu šiuo metu yra tiriamas, tačiau nustatyta, kad Rnq1 žymiai paspartina [*PSI*<sup>+</sup>] būvio atsiradimą ląstelėje. Manoma, kad Rnq1

padeda agreguotis Sup35 monomerams, tokiu būdu skatindamas polimerų susidarymą (Bagriantsev S. ir kt., 2004).

Baltyminių agregatų skaidyme dalyvaujančio mielių ląstelių baltyminio šaperono Hsp104 delecija sąlygoja  $[PSI^+]$  ir  $[PIN^+]$  praradimą. Būtina stabilaus mielių prionų paveldėjimo sąlyga yra tam tikras prioninių agregatų skaičius kiekvienoje ląstelėje, kuris perduodamas dukterinėms ląstelėms pumpuravimo metu. Pastaruoju metu atlikti tyrimai rodo, kad Hsp104 palaiko tam tikrą prioninių agregatų kiekį ląstelėje (Chernoff, 2001).

Guanidino hidroklorido pagalba užblokuojamas Hsp104 aktyvumas, ko pasekoje vyksta nevaldomas Sup35 polimerų augimas, lydymas prioninio būvio praradimo. Įdomu, kad guanidinhidrokloridas apsprendžia  $[PSI^+]$  ir  $[PIN^+]$  praradimą vadinamojoje „dviejų prionų“ ( $[PSI^+]$  ir  $[PIN^+]$ ) ląstelėje, šie prionai gali būti prarandami ir atskirai. Tokia prionų eliminavimosi iš ląstelių ypatybė leidžia daryti prielaidą, kad dviejų prionų ląstelė turi ne homogeniškus, bet heterogeniškus prioninius kūnelius (Bagriantsev S. ir kt., 2004).

Analogiškai žmogaus amiloidiniams baltymų susidarymo mechanizmui, mielių Sup35 ir Rnq1 baltymai formuoja amiloidines fibriles *in vivo* ir *in vitro*. Nustatyta, kad Rnq1 baltymo fibrilės įtakoja Gln/Asn turtingo Sup35 domeno polimerizacijos procesą. Naudojant fluorescenciniu metodu žymėtus Sup35 ir Rnq1 parodyta, kad naujai susiformavę Sup35 agregatai yra susijungę su Rnq1 agregatiniais dariniais. Šie stebėjimai leidžia daryti išvadą, kad  $[PIN^+]$  agregatiniai dariniai sąveikauja su Sup35 baltymu ir skatina  $[PSI^+]$  indukciją (Chernoff, 2001).

### 2.3. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* prioninės sistemos

Laboratoriniuose mielių *Saccharomyces cerevisiae* kamienuose aptinkama daug nechromosominių genetinių elementų: mitochondrinė DNR, 2 $\mu$  DNR plazmidė, L-A DNR virusai, M dsRNR, viengrandės RNR replikonai (20S RNR ir 23S RNR) bei infektyvūs baltyminiai prionai ( $[PSI^+]$ ; [URE3];  $[PIN^+]$ ;  $[\beta]$ ).  $[PSI^+]$ , [URE3] bei  $[PIN^+]$  yra amiloidinės baltymų Sup35, Ure2 ir Rnq1 formos, o  $[\beta]$  yra pūslelinė proteazė B, itin reikšminga mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių išgyvenimui stokojant mitybinių medžiagų. Visi šie veiksniai yra perduodami horizontalios pernašos būdu iš ląstelės ląstelei susimaišant citoplazmai kryžminimosi metu. Prioniniams dariniams taip pat būdinga pernaša citodukcijos tarp donoro ir recipiento būdu (Chernoff, 2001).

Nors visi [URE3] kamienai auga lėčiau ir yra jautresni kadmiui ( $Cd^{2+}$ ) bei nikeliui ( $Ni^{2+}$ ), tačiau *ure2* ląstelės pasiekia santykinai geresnį tankį ir geriau toleruoja natrio ( $Na^+$ ), ličio ( $Li^+$ ) bei



mangano ( $Mn^{+}$ ) jonus (Nakayashiki ir kt., 2005). *URE2* delecija sąlygoja lėtesnį augimą, tačiau skirtingai nuo *SUP35* delecijos, nėra letali (Nakayashiki ir kt., 2005).

[*URE3*] ir [*PSI<sup>+</sup>*] nebuvimas laukiniuose kamienuose rodo, kad šie prioniniai dariniai dar neatspindi susirgimo. Jų infektyvi prigimtis ir santykinis stabilumas, susijęs su spontaniniu grįžtamu atsiradimu ląstelių populiacijoje ( $10^{-6}$  dažniu) turėtų sąlygoti tokių infektyvių ląstelių atsiradimą ir laukinėse populiacijose. Todėl tikėtina, kad [*PSI<sup>+</sup>*] būvyje kai kurios mielių ląstelės tiesiog prisitaiko prie tam tikrų aplinkos sąlygų (Zhou ir kt., 1999).

Ląstelių atsakomoji reakcija yra vienas iš būdų prionų infektyvumo lygiui tirti. Ląstelių atsakas į stresines aplinkos reakcijas pasireiškia padidėjusia baltyminių šaperonų Hsp104 ir Ssa1 ekspresija. Nustatyta, kad mielių ląstelėse atsiradus [*URE3*] ir [*PSI<sup>+</sup>*] prionams yra stebima padidinta Hsp104 ir Ssa1 ekspresija ir tai rodo, jog ląstelės į šiuos prionus reaguoja kaip į stresinį veiksnį (Nakayashiki ir kt., 2005).

Siūlinės struktūros grybo *Podospora anserina* atveju sutinkamas [*Het-s*] prionas, kuris yra atsakingas už heterokarionų tarpusavio suderinamumą. Normalus šios funkcijos palaikymas yra būdingas visiems siūliniams grybams ir užtikrina apsaugą nuo dvigrandės RNR virusų. Todėl beveik visi išskirti laukinio tipo kamienai turi [*Het-s*] prioną. Pastarasis prionas formuoja išilgėjusio pavidalo agregatinius darinius *in vivo*, kurie didėja lateraliai jungiantis trumpesniems fibriliniams dariniams (Bagriantsev S. ir kt., 2004). Pažymėtina, kad [*Het-s*] prionas yra atsakingas už ypatingą mejotinį fenomeną, kurio metu yra išžudomos į citoplazmą patekusios sporos, neformuojančios prioninio fenotipo. Šis faktas leidžia manyti [*Het-s*] prioną esant neatskiriamu *het-s* alelio paveldėjimo veiksmu (Zhou ir kt., 1999).

### 2.3.1. Prionų silpnų ir stiprių variantų ypatybės

Mielių *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI<sup>+</sup>*] prionas aptinkamas pagal nonsens kodonų supresiją. [*PSI<sup>+</sup>*] yra baltyminis genetinis veiksnys, [*psi<sup>-</sup>*] ląstelėse atsirandantis spontaniškai (Derkatch ir kt., 1996). Mielių [*PSI<sup>+</sup>*] prionas turi daug bendrų bruožų su žinduolių prionais, jų tarpe ir paveldimus variantus, pasižyminčius skirtingomis biologinėmis savybėmis, pasireiškiančiomis esant tam pačiam genetiniam pagrindui (Caughey, 2001).

[*PSI<sup>+</sup>*] kamienai skirstomi pagal translacijos terminacijos netikslumų laipsnį ir pagal stabilumo lygį, kuriuo jie išlieka dukterinėse ląstelėse. Pagal šias ypatybes [*PSI<sup>+</sup>*] kamienai skirstomi į stiprius ir silpnus variantus. Silpni [*PSI<sup>+</sup>*] variantai nonsens mutacijas supresuoja ne taip

veiksmingai kaip stiprūs  $[PSI^+]$  variantai ir yra mažiau stabilūs paveldėjimo atžvilgiu (Derkatch ir kt., 1996). Naujai atsiradusios prionizuotos ląstelės negali savaime „persijungti“ iš stipraus į silpną variantą arba atvirkščiai.  $[PSI^+]$  variantai atsiranda spontaniškai arba *de novo*, esant perteklinei Sup35 baltymo ekspresijai (Derkatch ir kt., 1996). Prionizuotų ląstelių variantai nėra sąlygoti genetinių skirtumų: kai genetiškai tapačiuose  $[PSI^+]$  variantuose pavyksta eliminuoti  $[PSI^+]$  prioną ir indukuojasi nauji  $[PSI^+]$  elementai, juose pakartotinai pasireiškia silpnų ir stiprių variantų spektras (Derkatch ir kt., 1996). Tai leidžia daryti išvadą, kad šis fenomenas nėra sąlygotas naujų mutacijų, atsirandančių Sup35 baltymo molekulėje, o yra epigenetinis reiškinys.

Apie molekulinės  $[PSI^+]$  variantų pusės ypatybes dar nėra pakankamai žinių, tačiau nustatyta, kad silpni  $[PSI^+]$  variantai pasižymi didesniu Sup35 baltymo tirpumu, negu stiprūs  $[PSI^+]$  variantai. Ypatingai silpnas  $[PSI^+]$  variantas  $[ETA^+]$  turi daug kartų tirpesnį Sup35 baltymą nei stiprūs  $[PSI^+]$  variantai (Zhou ir kt., 1999). Didesnis Sup35 baltymo tirpumas sąlygoja silpnesnius transliacijos terminacijos netikslumus.

Nustatytos trys galimos stiprių ir silpnų  $[PSI^+]$  variantų egzistavimo priežastys. Pirma, Sup35 baltymo NM fragmentas formuoja skirtingomis biocheminėmis savybėmis pasižyminčias amiloidines fibriles *in vitro*. Tokiu būdu Sup35 baltymas įgauna skirtingas konformacijas, ko pasekoje atsiranda skirtingos galimybės ląstelėms tapti prionizuotomis. Antra, manoma, kad stipriųjų variantų agregatai yra mažesni ir skaitlingesni negu silpnų variantų agregatai. Tai įgalina efektyviau versti Sup35 baltymą prionizuota forma ir efektyviau perduoti prionizuotą variantą dukterinėms ląstelėms. Trečia, priono būviui ląstelėje įtakos turi ir Sup35 baltymo bei kitų ląstelinių veiksnių sąveika.

Šie veiksniai yra molekuliniai šaperonai ir daug glutamino bei asparagino turintys baltymai. Molekulinių šaperonų lygio pokyčiai daro ženkliai įtaką skirtingų  $[PSI^+]$  variantų raiškai (Chernoff ir kt., 1995). Sis1 ir Ssa1 šaperonai stabiliai sąveikauja tik su prionizuota Rnq1 baltymo forma (Sondheimer ir kt., 2001). Mažiausiai 12 glutamino ir asparagino turtingų baltymų bei Rnq1 baltymas sąlygoja  $[psi^-]$  ląstelių vartimą prionizuotomis  $[PSI^+]$  ląstelėmis (Derkatch ir kt., 2001), tačiau šie baltymai nėra būtini  $[PSI^+]$  palaikymui. Silpnų bei stiprių  $[PSI^+]$  variantų analizė dar nėra galutinai atlikta bei reikalauja detalesnių tyrimų.

### 2.3.2. Prionų tarpusavio sąveikos

Mielėse tirti pakitusios konformacijos baltymai - prionai:  $[PSI^+]$ ,  $[URE3]$  ir  $[PIN^+]$  (Derkatch ir kt., 2001).  $[PSI^+]$  yra prioninė transliacijos terminacijos veiksnio Sup35 forma (Liebman ir kt.,

1999; Serio ir kt., 1999; Wickner ir kt., 2001), [URE3] yra azoto katabolinio represoriaus Ure2 forma (Wickner, 1994), o [PIN<sup>+</sup>] yra Rnq1 baltymo prioninė forma (Sondheimer ir kt., 2000). Sup35 ([PSI<sup>+</sup>] ląstelėse) baltymų ir Ure2 ([URE3] ląstelėse) baltymų inaktyvacija vyksta dėl agregacijos, kuri sąlygoja tokį patį fenotipą kaip ir mutacijos SUP35 ir URE2 genuose. RNQ geno inaktyvacijos fenotipinė išraiška dar nėra nustatyta.

[PSI<sup>+</sup>], [PIN<sup>+</sup>] ir [URE3] prionai *de novo* atsiranda dėl perteklinės prioninių baltyminių domenų ekspresijos (Sondheimer ir kt., 2000; Derkatch ir kt., 1996). Padidėjęs baltymo molekulių skaičius padidina prioninių centrų formavimąsi *de novo*. Tačiau kai kurių prionų atsiradimas *de novo* priklauso nuo kitų prionų ar prioninių darinių buvimo ląstelėje (Derkatch ir kt., 2001; Osherovich ir kt., 2001). [PIN<sup>+</sup>] buvo tirtas kaip prioninis elementas, kurio poveikyje [psi<sup>-</sup>] ląstelės virsta į [PSI<sup>+</sup>] ląsteles ir tik vėliau nustatyta, kad [PIN<sup>+</sup>] yra prioninė Rnq1 baltymo forma (Derkatch ir kt., 2001). [URE3] ar dirbtinio [NU<sup>+</sup>], t.y. New1-Sup35 baltymų hibridinio (Osherovich ir kt., 2001) priono buvimas taip pat sąlygoja [PSI<sup>+</sup>] priono atsiradimą netgi nesant [PIN<sup>+</sup>].

Skirtingi [PSI<sup>+</sup>] kamienai pasižymi skirtingu mitoziniu stabilumu, ([PSI<sup>+</sup>] praradimo dažniu), nonsens kodonų supresijos efektyvumu ir skirtingais normalios konformacijos Sup35 baltymo kiekiais (Zhou ir kt., 1999). Silpnų [PSI<sup>+</sup>] stabilumas mitozės metu yra mažesnis negu stiprių [PSI<sup>+</sup>] (Derkatch ir kt., 1996), o normalios konformacijos Sup35 baltymų kiekis-didesnis (Osherovich ir kt., 2001). [PSI<sup>+</sup>] kamienai taip pat skirstomi pagal jų atsaką į mutacijas SUP35 gene (Derkatch ir kt., 1999; King, 2001) ir pagal atsaką į baltyminius šaperonus (Kushnirov ir kt., 2000).

Prionų egzistavimas ląstelėje priklauso nuo baltymų šaperonų lygio. Atradimas, kad HSP104 geno delecija ar perteklinė ekspresija sąlygoja [PSI<sup>+</sup>] eliminaciją, patvirtino prioninę [PSI<sup>+</sup>] modelį (Chernoff ir kt., 1995). Taip pat nustatyta, kad perteklinė Hsp104 šaperono ekspresija įtakoja ir [URE3] bei [PIN<sup>+</sup>] eliminaciją (Moriyama ir kt., 2000; Sondheimer ir kt., 2001). Hsp104 veikia kartu su Hsp40 ir Hsp70, atstatydamas baltyminių agregatų struktūrą (Parsell ir kt., 1994). Hsp104 poveikis [PSI<sup>+</sup>] priklauso nuo Hsp70 šeimos Ssa ir Ssb baltymų (Kushnirov ir kt., 2000). Prioninei Rnq1 baltymo formai palaikyti būtinas Hsp40 šeimos Sis1 baltymas (Sondheimer ir kt., 2001).

Prionizuotos ląstelės susidaro citoplazmoje, kai tirpi baltymo forma virsta netirpia, veikiant įvairiems ląstelės vidinės ir išorinės aplinkos veiksniams. Mielijų ląstelių virtime prioninėmis Hsp104 šaperonas suardo stabilius baltymų agregatus į smulkesnes daleles, vadinamas prioniniais pradmenimis, kurie yra efektyviau pernešami dukterinėms ląstelėms (Chernoff ir kt., 1995; Jung ir kt., 2000). Hsp104 perteklinė ekspresija įtakoja [PSI<sup>+</sup>] praradimą, tačiau Hsp104 šaperono perteklinė ekspresija neeliminuoja iš ląstelių [URE3] priono (Moriyama ir kt., 2000). Tai leidžia manyti [PSI<sup>+</sup>] ir [URE3] prionus esant skirtingais pagal giminingumą baltymams-šaperonams.

Perteklinė prioninio baltymo ekspresija didina prionizuotų ląstelių atsiradimo dažnį, kadangi daugėja baltymo molekulių, galinčių pereiti į prioninę konformaciją.  $[PIN^+]$  būvis sąlygoja didesnę tikimybę  $[PSI^+]$  atsiradimui ne tik dėl perteklinės Sup35 baltymo ekspresijos, bet ir dėl Rnq1 baltymo agregacijos (Derkatch ir kt., 2001; Derkatch ir kt., 1996).  $[PSI^+]$  ir  $[URE3]$  taip pat gali indukuoti  $[PIN^+]$  atsiradimą dėl Rnq1 baltymo agregacijos (Derkatch ir kt., 2001).

Baltymo Hsp104 kiekis  $[PSI^+]$  ląstelėse yra didesnis esant  $[URE3]$ , todėl  $[URE3]$  yra viena iš  $[PSI^+]$  efektyvios eliminacijos sąlygų. Skirtingai nuo Hsp104 baltymo, Ssa1 baltymo perteklinė ekspresija stipriai įtakoja  $[URE3]$  eliminaciją, neturėdama poveikio  $[PSI^+]$  ląstelėms (Moriyama ir kt., 2000).

## 2.4. Prioninių Sup35 baltymo fibrilių formavimosi mechanizmas

Sup35 baltymas sudarytas iš N-galinio, vidurinio-M ir C-galinio domenų. N-galinį domeną sudaro 123 amino rūgštys, kurių tarpe daugiausia yra gliutamino ir asparagino. Šis domenas atsakingas už agregatinių darinių formavimosi pobūdį. N-galinio domeno amino grupės sritis formuoja amiloidines fibriles *in vitro* ir yra vadinama „prioniniu domenu“. Bandymų metu nustatyta, kad esant mutacijoms N-galinio domeno 22 amino rūgščių ilgio šerdinėje dalyje yra įtakojamas prioninio būvio pasireiškimas *in vivo* (Narayanan ir kt., 2006).

M domenas didina Sup35 baltymo tirpumą ir reguliuoja prioninį būvį *in vivo*. C-galinis domenas turi GTP prijungimo sritį ir sąveikauja su kitu svarbiu transliacijos terminacijos veiksmu–Sup45. Tyrimais buvo nustatyta, kad N-galinio domeno 21–38 amino rūgščių liekanos ir C-galinio domeno 91–108 amino rūgščių liekanos sąveikauja tarpusavyje vidumolekuliniame lygmenyje. Pažymėtina tai, jog šerdinei daliai tokio pobūdžio sąveikos nebūdingos (Narayanan ir kt., 2006).

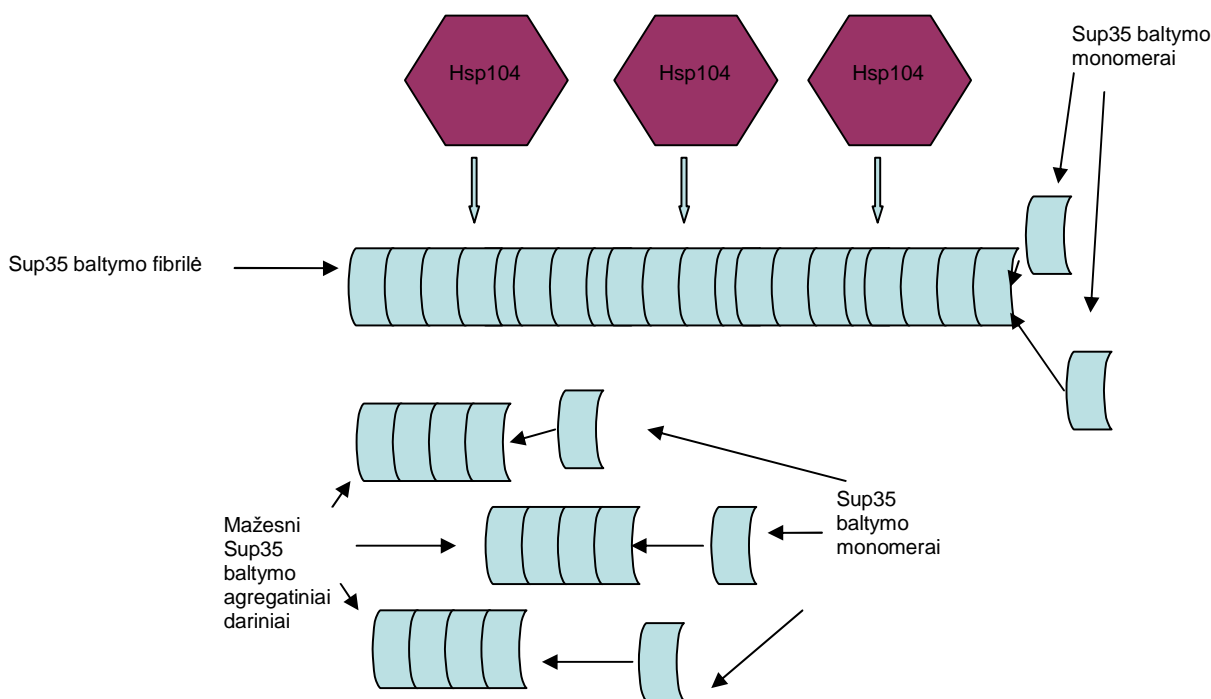
Nustatyta, kad Hsp104 šaperonas katalizuoja konformacinį Sup35 baltymo virsmą iš heksamerinės į monomerinę formą. Hsp104 atstovauja Clp/Hsp100 baltymų šeimą, kuri apima karščiu indukuojamus sudėtingos oligomerinės struktūros molekulinis šaperonus. Hsp104 prionizuotoje ląstelėje palaiko arba padeda eliminuoti prioniniams dariniams veikdamas priklausomai nuo koncentracijos. Hsp104 veikia kaip molekulinės „žirklės“, sukarpančios fibrilinius darinius iki atskirų fragmentų. Šie oligomeriniai fragmentai yra naujų prioninių darinių polimerizacijos procese pradmenys (Narayanan ir kt., 2006).

### 2.4.1. Šaperoninio baltymo Hsp104 įtaka prionizacijai

Kai kurie baltymai savo natyvų būvį keičia į pakitusį prioninį būvį. Mielėse egzistuoja keli baltymai, galintys vykdyti tokio pobūdžio pokyčius. Labiausiai ištyrinėtas jų tarpe yra transliacijos terminacijos veiksnys Sup35 bei Ure2, kuris reguliuoja azoto metabolinius procesus. Prioninis baltymų būvis stabiliai išlieka net keliose generacijose. Sup35 baltymo prioninis būvis dalinai pasireiškia žemu funkcionalaus Sup35 baltymo tirpumo lygiu ir baltymų transliacijos terminacijos sutrikimais, dar įvardijamais kaip nonsens supresija. Panašiai kaip ir žinduolių prionai, skirtingi [*PSI*<sup>+</sup>] variantai yra apibrėžiami kaip „stiprūs“ arba „silpni“ atitinkamai pagal jų struktūrą bei kitas ypatybes (Kryndushkin ir kt., 2003).

„Stiprieji“ [*PSI*<sup>+</sup>] variantai pasižymi stipria nonsens supresija ir dideliu mitotiniu stabilumu, o „silpniesiems“ [*PSI*<sup>+</sup>] variantams būdinga silpnesnė supresija bei mažesnis mitotinis stabilumas. Baltymų transliacijos terminacijos lygis atvirkščiai proporcingas tirpaus Sup35 lygiui ląstelėje (Kryndushkin ir kt., 2003).

[*PSI*<sup>+</sup>] palaikyme svarbūs Hsp40 ir Hsp70 šaperoniniai baltymai, tačiau svarbiausias čia yra Hsp104 šaperonas. Pastarasis šaperoninis baltymas yra vienintelis baltymas, būtinas [*PSI*<sup>+</sup>] ir kitų prionų palaikymo ląstelėje procesui. Hsp104 baltymo perteklinė ekspresija sąlygoja [*PSI*<sup>+</sup>] būvio praradimą arba nonsens supresijos nebuvimą [*PSI*<sup>+</sup>] būvio atveju. Hsp104 didelius prioninius agregatinius denatūruotų baltymų darinius skaldo į mažesnius (1 pav.), tokiu būdu platindamas juos tarp ląstelių (Kryndushkin ir kt., 2003).



Pav. 1. Šaperono Hsp104 veikimo modelis (pagal Kyprianidou Ch., 2003)

Nustatyta, kad Hsp104 šaperonas veikia tiksliai į pluoštinius prioninius polimerinius darinius, taip suskaidydamas juos iki smulkesnių ir trumpesnių polimerų bei tuo pačiu didindamas pastarųjų skaičių ląstelėje. Šis prioninių polimerinių darinių trumpinimas ir smulkinimo procesas sąlygoja fibrilių augimą ties kiekvieno polimero galų sritimis (Kryndushkin ir kt., 2003).

Hsp104 aktyvumas yra inhibuojamas mielių ląsteles auginant terpėje su guanidinhidrochloridu (GuHCl), kurio veikimo pasekoje iš ląstelės eliminuojami  $[PSI^+]$  ir kiti prionai. Ištyrus GuHCl poveikį prionų eliminacijai nustatyta, kad GuHCl blokuoja prioninių pradmenų replikaciją (Kryndushkin ir kt., 2003).

*In vitro* išgryninti Sup35 ir Ure2 baltymai sudaro vienodos sandaros amiloidinius darinius. Manoma, kad *in vivo* prioniniai dariniai formuoja panašias struktūras, dar vadinamas prioniniais polimerais. Elektroninės mikroskopijos metodais nustatyta, kad  $[URE3]$  atveju šie dariniai yra mažų fibrilių, susijungusių su Ure2 baltymo molekulėmis, tinklas (Kryndushkin ir kt., 2003).

Tiriant prionų struktūrą ir palaikymo ląstelėje mechanizmus tikslinga nustatyti mielių prioninių polimerų dydį. Centrifugavimo ar suliejimo su fluorescentiniais baltymais metodika leidžia nustatyti prioninių darinių egzistavimą, tačiau pastaruoju metu iškelta hipotezė, jog šiais būdais

nustatomos kompleksinės prioninės polimerinės struktūros, o ne atskiri polimerai. Todėl tikslesnis prioninių polimerų dydis nustatomas elektroforetiniais metodais (Kryndushkin ir kt., 2003).

#### 2.4.2. Šaperono Hsp70 ir prioninių pradmenų replikacijos sąsaja

Šaperoninis baltymas Hsp70 reikalingas Hsp104 veikimui prioninių baltyminių darinių ardymui *in vitro* metu. Hsp70 baltymas priklauso konservatyvių baltyminių šaperonų grupei, kuri dalyvauja baltymų prisitvirtinimo procese ir apsaugo nepilnai prisitvirtinčius baltymus nuo jungimosi į agregatinius darinius. Šaperoniniai baltymai svarbūs ląstelėje vykstantiems gyvybiniais procesams bei prisitaikymo prie įvairių aplinkos veiksnių užtikrinimui (Song ir kt., 2004).

Mielėse *Saccharomyces cerevisiae* yra keturi citozoliniai Hsp70 baltymai, priklausantys Ssa1 pošeimiui. Mažiausiai vieno iš šių baltymų ekspresija yra būtina ląstelių augimo užtikrinimui. Ssa1 baltymas yra vienas iš šaperoninių Hsp70 baltymų. Buvo nustatytas dominantinis mutantinis Ssa1 baltymas (Ssa1-21), inhibuojantis priono  $[PSI^+]$  plitimą, silpninantis  $[PSI^+]$  sąlygotą fenotipą bei įtakojantis mitotinį  $[PSI^+]$  praradimą. Šis  $[PSI^+]$  nestabilumas yra sumažėjusio prioninių pradmenų skaičiaus ląstelėje paseka. Nustatyta, kad Ssa1 baltymas tiesiogiai įtakoja  $[PSI^+]$  prioninių pradmenų susidarymo ląstelėje procesą (Song ir kt., 2004).

Tyrimais parodyta, kad didelės molekulinės masės prioniniai dariniai, išskirti iš  $[PSI^+]$  ląstelių, yra sudaryti iš stambių agregatinių junginių ir mažesnių, sodos dodecilsulfato tirpale netirpstančių Sup35 baltymo polimerų. Nesant aplinkoje sodos dodecilsulfato, polimerai išsiskaido tarp didžiųjų agregatinių junginių, kurių dydis kartais 30 kartų viršija polimerų dydį. Denatūruojančiomis sąlygomis agregatiniai junginiai iškrinta į nuosėdas, tačiau sodos dodecilsulfate netirpūs 9-50-ies monomerų dydžio polimeriniai dariniai išlieka. Manoma, kad dideli agregatiniai junginiai yra sudaryti iš atskirų Sup35 baltymo polimerų, kurie turi papildomas jungtis tarpusavyje, o Hsp104 šaperonas padeda susidaryti naujiems  $[PSI^+]$  prioniniams pradmenims polimerų skaidymo į skaitlingesnes daleles metu (Song ir kt., 2004).

Ssa1-21 baltymo veikimas primena Hsp104 veikimą bei apsprendžia  $[PSI^+]$  pradmenų plitimą tarp ląstelių. Ssa1-21 pasižymi stipresniu sukibimu su substratu, todėl stipriau susijungia su agregatiniais Sup35 baltymo junginiais. Hsp70 baltymo aktyvumas skatina agregatinių darinių susiskaidymą iki polimerų tiesioginio poveikio pasekoje arba sąveikos su Hsp104 šaperonu metu. Nepaisant to, kad inhibicinis Hsp104 šaperono poveikis turėtų didinti Sup35 baltymo agregatinių junginių dydį, tačiau šiuo atveju didėja atskirų polimerinių struktūrų dydis (Song ir kt., 2004).

Nustatyta, kad laukinio tipo Ssa1 baltymas taip pat sąlygoja Sup35 baltymo agregatinių junginių susidarymą prionizuotose ląstelėse. Tai leidžia manyti, kad Ssa1 baltymas padeda Sup35 baltymui sudaryti tokius agregatinius darinius, kurie yra mažiau jautrūs ardančiam Hsp104 šaperono poveikiui. Skirtingai nuo Ssa1-21, perteklinė Ssa1 baltymo ekspresija didina nonsens supresijos efektyvumą bei neturi įtakos prioninio būvio stabilumui (Song ir kt., 2004).

### **2.4.3. Aktino citoskeleto vaidmuo Sup35 baltymo agregacijoje**

Mielių aktino citoskeletas vaidina svarbų vaidmenį prioninių darinių formavimosi procese. Sup35 baltymo prioninis domenas sąveikauja su citoskeleto struktūromis tam tikrų mechanizmų pagalba. Endocitotinių pūslelių susiliejimas ir judėjimas išilgai endosominės ar pūslelinės sistemų apima aktino polimerizacijos ir depolimerizacijos procesus, lydymus amiloidogenezės (Ganusova ir kt., 2006).

Prioninės infekcijos ląstelėje plinta prioninių baltymų dėka ir nėra susijusios su nukleorūgščių pernaša. Parodyta, kad prioninį būvį ląstelės įgauna tam tikrų specifinių polimerizacijos mechanizmų poveikyje, kurio eigos ypatybės yra analogiškos citoskeletinių filamentinių struktūrų susidarymui. Prioninio baltymo Sup35 polimerizacijos pasekoje susidaro dideli agregatiniai dariniai, palaikantys  $[PSI^+]$  būvį ląstelėje. Prioninių darinių formavimosi ir citoskeletinių fibrilių polimerizacijos procesų tarpusavio panašumai leidžia manyti, kad pastarieji procesai yra susiję (Bailleul ir kt., 1999).

Mielių baltymas Sup35 yra sudarytas iš trijų domenų: Sup35N, Sup35M ir Sup35C. Sup35N domenas atsako už  $[PSI^+]$  būvį ląstelėje ir turi kartotines oligopeptidines sekas, kuriose yra daug Pro, Gly ir Gln liekanų. Buvo nustatyta, kad dalyvaujantis aktino mikrofilamentų darinių formavimesi mielių baltymas Sla1, sąveikauja su Sup35N domenu (Bailleul ir kt., 1999).

Citoskeletinio tinklo fibrilės pereina eilę susijungimo ir atsikabinimo procesų, kurie yra susiję su poliniu ląstelės augimu, pumpurų sudarymu, citokineze bei aplinkos signalais. Nepaisant to, kad Sla1 baltymas nėra būtinas ląstelės gyvybingumo užtikrinimui ir citoskeleto formavimuisi, tačiau *sla1* mutacijos ir tampa letaliomis tuo atveju, kai yra lydimos mutacijų ir delecijų kai kuriuose kituose genuose, atsakančiuose už citoskeletinių susijungimo baltymų veikimą, pvz.: Abp1, Bee1 ir Pan1 baltymai (Bailleul ir kt., 1999).

Amiloidinių darinių formavimesi dalyvauja pūslelių susirinkimo aparato baltymai, tokie kaip Pan1/Sla1/End3 baltyminis kompleksas bei baltymai Sla2, Arp2 ir Arp3. Sla1, vienas iš baltymų,



sąveikaujančių su Sup35 baltymo N domenu, turi kartotinių oligopeptidinių sekų sritis, išsidėsčiusias C–galiniame regione (Ganusova ir kt., 2006).

Mutantiniai kamienai su defektyviais prioniniais dariniais neretai pasižymi toksinėmis savybėmis, kurias sąlygoja perteklinė baltymo Sup35 ekspresija. Šis reiškinys yra lydimas didelio ląstelių letalumo, tačiau jį nebūtinai atspindi didelės prioninių darinių sancaupos ląstelėje. Didelių Sup35 baltymo kiekių judėjimas ląstelės citoplazma yra toksinis, todėl ląstelių ypatybė tokius perteklinius baltymus surinkti į didelius agregatinius darinius aktino citoskeleto pagalba atlieka apsauginį vaidmenį ląstelėje (Ganusova ir kt., 2006).

Tyrimais nustatyta, kad mažos nesugrupuotų baltymų sancaupos, galinčios inhibuoti šio grupavimo mechanizmus arba proteolitinį veikimą, yra daug toksiškesnės negu didelės struktūrizuotos baltymų grupės, kurios yra prijungtos prie tam tikrų ląstelės kompartmentų ir tokiu būdu santykinai atskirtos nuo citoplazmos (Ganusova ir kt., 2006).

Bandymai parodė, kad baltymo Sla1 C domenas yra hidrofobinis ir turi daug Pro ir Gly liekanų bei kartotinių sekų, kurios yra panašios į Sup35 baltymo sekas. Tai yra įrodymas, kad Sup35-Sla1 baltymų tarpusavio sąveika yra paremta nespecifinių hidrofobinių jungčių, susidarantių tarp panašių amino rūgštimis baltymų veikimu (Bailleul ir kt., 1999).

Sla1 baltymas ląstelėje dalyvauja aktino mikrofilamentų išsidėstyme viduląstelinėse citoskeletinių tinklų formavimosi metu. Buvo įrodyta, kad perteklinė kai kurių citoskeletinių baltymų ekspresija sąlygoja mielių ląstelių augimo netikslumus. Pažymėtina, kad Sup35 ir Sla1 baltymų struktūrinis palyginimas leidžia daryti išvadą, kad pastarieji baltymai turi daug panašumų: turi Pro, Gly ir Gln turtingus galinius domenus (Sup35 atveju tai yra N domenas, Sla1 atveju-C domenas), turi Gly turtingą vidurinę domeną (atitinkamai Sup35M ir Sla1M) bei likusius domenus (atitinkamai Sup35C ir Sla1N). Manoma, kad oligopeptidinės kartotinės sekos yra vidumolekulinių ryšių tarp Sup35 ir Sla1 baltymų rodiklis (Bailleul ir kt., 1999).

Sla1 yra pirmasis su citoskeletinėmis struktūromis susijęs baltymas, dalyvaujantis [*PSI*<sup>+</sup>] būvio palaikyme ląstelėje. Sla1 baltymas veikia baltyminių kompleksų, atsakančių už polimerinių struktūrų, jų tarpe ir prioninių, atsiradimą ir didėjimą, formavimosi procese. Įprastai Sla1 baltymas prioninių pradmenų replikacijoje dalyvauja silpniau ir Sla1 praradimą atstoja kiti specialūs ląstelės baltymai (Bailleul ir kt., 1999).

Sla1 baltymo svarba padidėja normaliai [*PSI*<sup>+</sup>] reprodukcijai pakitus ląstelinėse (perteklinio Hsp104 veikimas) arba cheminių (DMSO veikimas) veiksmų pasekoje. Šiuo atveju Sla1 baltymo nebuvimas ar veikimo sutrikimai sąlygoja ženklus [*PSI*<sup>+</sup>] būvio stabilumo pokyčius. Manoma, kad

Sla1 baltymas dalyvauja prionų atkūrimo, kai  $[PSI^+]$  agregatiniai dariniai yra suardomi iki oligomerų ar atskirų monomerų. Šis prionų atkūrimo procesas yra susijęs su naujų prioninių pradmenų susidarymu tose vietose, kuriose sąveikauja Sla1 ir Sup35 baltymai (Bailleul ir kt., 1999).

Tiriant citoskeletinio aparato įtaką prionizuoto ląstelės būvio palaikyme nustatyta, kad  $[PSI^+]$  būvio ląstelėse prioniniai dariniai nėra susijungę su aktino struktūromis, tačiau sąveikauja su kitais citoskeletiniais komponentais, tokiais kaip Sla1 ir Sla2 baltymai. Ilgalaikis aktino ardymas latrunkulinu A sąlygoja  $[PSI^+]$  eliminaciją. Tai leidžia manyti, kad kai kurie citoskeletiniai aktino komponentai valdo prionizacijos proceso eigą, sąveikos metu su nesugrupuotais prioniniais baltymais išdėstydami pastaruosius reikiamu būdu (Ganusova ir kt., 2006).

Kai kuriais atvejais  $[PSI^+]$  eliminaciją apsprendžia kai kurios cheminės medžiagos, tokios kaip dimetilsulfoksidai. Tačiau pažymėtina, kad citoskeletinis aparatas veikia ne vien *de novo* prionų susidaryme, bet ir jų atstatymo po įvairių eliminavimo būdų. Tikėtina, kad  $[PSI^+]$  atsistatymas ląstelėje po šaperonų poveikio vyksta keliu, kurį reguliuoja citoskeletiniai komponentai. Procese dalyvauja ir tos tarpinės prioninės struktūros, kurios susidaro  $[PSI^+]$  indukcijos *de novo* atveju (Ganusova ir kt., 2006).

Tokiu būdu baltymai, susiję su sudėtingos struktūros citoskeletinių darinių formavimusi ląstelėje dalyvauja ir naujų prioninių formų susidaryme.  $[PSI^+]$  prionas tėra vienas tokio mechanizmo pavyzdys, reikalaujantis nuodugnių tyrimų bei detalesnės veikimo analizės.

## 2.5. Kilerinės mielių sistemos

Kilerinių toksinų sintezė yra būdingas reiškinys daugelio mielių genčių ir rūšių tarpe. Kilerinis aktyvumas nustatomas tiriant jautrų kileriniams toksinams kamieną. Kilerinės mielės išskiria skirtingo tipo toksinus, pasižyminčius aktyvumais, specifiniais tam tikroms taikininėms mielių ląstelėms.

Mielių *Saccharomyces* atveju nustatytos trys kilerinių toksinų rūšys (K1, K2 ir K28), kuriuos koduoja M dsRNR. Kileriniai virusai yra išsidėstę infekuotos ląstelės citoplazmoje. Visų trijų rūšių toksinus produkuojančios mielės letaliai veikia nekilerines mieles, tačiau yra atsparios savo bei tos pačios kilerinės grupės išskiriamo toksino poveikiui (Schmitt ir kt., 1995).

Visus tris kilerinius toksinus koduojančios M dsRNR skiriasi tarpusavyje dydžiu, pagal kurį yra skirstomos į M1 (1,8 kb), M2 (1,5 kb) ir M28 (2,0 kb) ir yra šiek tiek homologiškos. M dsRNR turintys virusai yra defektyvios dalelės, priklausančios nuo didesnių dsRNR, dar įvardijamų kaip L-

A (4,6 kb), kurios yra citoplazmiškai paveldimos ir bei inkapsiduotos į virusus panašiose dalelėse (VPD). L-A dsRNR koduoja kapsidę, esančią M ir L-A VPD bei kapsidės polimerazinį susiliejimo baltymą, mažais kiekiais randamą šiose VPD (Schmitt ir kt., 1995).

K1 ir K2 kilerinės grupės pasižymi identišku toksinų aktyvumu: abiejų tipų toksinai jungiasi prie  $\beta$ -1,6-D-gliukano ląstelės sienelėje bei suardo jonų mainų barjerą taikinio plazminėje membranoje. Ši pastarųjų toksinų savybė sąlygoja ATP,  $K^+$  bei kitų ląstelės gyvybinei veiklai svarbių komponentų pasišalinimą ir tuo pačiu lemia neprogramuotą ląstelės žūtį. K28 kilerinės grupės toksinas jungiasi prie  $\beta$ -1,3-jungtimis sujungtų manozės liekanų jautrių toksinui kamienų ląstelėse ir sąlygoja grįžtamos DNR sintezės inhibiciją (Schmitt ir kt., 1995).

## 2.6. [*KIL-d*] veiksnio reikšmė mielių genų ekspresijos reguliacijoje

Mielių *Saccharomyces cerevisiae* kileriniai virusai yra citoplazminiu keliu paveldimi virusai, sudaryti iš dvigrandės RNR (dsRNR) (Talloczy ir kt., 2000). Virusinis genomus yra sudarytas iš L-A dsRNR ir iš M palydovinės dsRNR. L-A dsRNR veikia kaip pagalbinis genomus ir yra daugelyje mielių kamienų. Tuo tarpu M satelitinė dsRNR aptinkama tik kileriniuose mielių kamienuose. Šios dsRNR replikacijos procesas priklauso nuo L-A dsRNR (Talloczy ir kt., 2000).

Ląstelės, turinčios M dsRNR, išskiria toksiną, kuris žudo jam jautrias ląsteles. Toksiną išskiriančios ląstelės yra atsparios jo poveikiui. Infekuotos laukinio tipo ląstelės turi  $K^+$  (angl. "killing"-žudantis) ir  $R^+$  (angl. "resistance"-atsparumo) fenotipus, o ląstelės, neturinčios M dsRNR, yra  $K^-R^-$  fenotipo. Jautrumą ir atsparumą toksinui apsprendžia preprotoksino sintezė. Yra nustatyti skirtingi M dsRNR tipai (M1 ir M2), koduojantys du preprotoksino baltymus (Talloczy ir kt., 2000).

M1 ir M2 tipų ląstelės pasižymi atsparumu to paties tipo toksinui, tačiau yra jautrios kitų tipų toksinams. Tuo atveju, kai dviejų tipų M dsRNR yra patalpinama į tą pačią ląstelę, stebimas tam tikras nesuderinamumas, kuris pasireiškia vieno (dažniausiai-M1) tipo dominavimu, o kito-praradimu. Tokio pobūdžio mutacijos sąlygoja yra spartesnę replikaciją ir padidėjusią ekspresiją ląstelėse (Talloczy ir kt., 2000).

Po mutagenezės etilmetano sulfonatu buvo nustatyti mutantai, turintys citoplazmiškai paveldimą [*KIL-d*] veiksnį, kurie pasižymėjo skirtingų tipų fenotipais, t.y.  $K^-R^+$ ,  $K^+R^-$ ,  $K^-R^-$  bei tarpiniais "silpnais" fenotipais. Šie mutantai praranda M dsRNR vegetatyvinio augimo metu, ko pasekoje atsiranda atsitiktiniai  $K^-R^-$  segregantai. Sukryžminus [*KIL-d*] kamieną, turintį M dsRNR su laukinio tipo nekileriniu kamieniu, neturinčiu M dsRNR, susidaro  $K^+R^+$  fenotipo diploidai. Ištyrus

mejotinės sporuliacijos rezultatus matyti, kad susidarę klonai pasižymi įvairaus tipo mitotiškai stabiliais fenotipais. Šių klonų M dsRNR stabilumas irgi yra didesnis (Talloczy ir kt., 2000) .

Be to, buvo parodyta, kad [*KIL-d*] veiksnys yra pernešamas kartu su M dsRNR tarp dviejų haploidinių kamienų citoplazminės pernašos (citodukcijos) būdu. Recipiente šis veiksnys fenotipiškai pasireiškia tik ties kryžminimosi bei mejotinės sporuliacijos stadijomis. Klonuose stebima defektyvių fenotipų variacija (Talloczy ir kt., 2000). Nustatyta, kad [*KIL-d*] haploidams, turintiems defektyvų fenotipą, būdingas spontaniškas grįžtamumas į laukinį  $K^+R^+$  fenotipą  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  dažniu. Ši reversija ląstelėse pasireiškia mitotiškai stabiliu [*KIL-d*] fenotipu. [*KIL-d*] veiksnio buvimas ląstelėje nuo Hsp104 baltymo nepriklauso (Talloczy ir kt., 2000).

Kamienuose, turinčiuose [*KIL-d*], vykdamas įvairių citoplazminių elementų (pavyzdžiui, mitochondrinės DNR ar M bei L-A dsRNR) eliminaciją, [*KIL-d*] veiksnys neprarandamas. Iš kamienų karščių eliminavus M dsRNR juose lieka su ja susijusių sekų ir manoma, kad [*KIL-d*] lieka prisijungęs prie karščio poveikio išvengusios RNR (Talloczy ir kt., 2000). Šiuo tikslu buvo atlikta mutantinių kamienų, neturinčių L-A ir M dsRNR, analizė, kuria siekta nustatyti [*KIL-d*] veiksnio palaikymo tokiuose kamienuose galimybę. [*KIL-d*]  $K^-R^w$  (w-laukinis tipas; angl. "wild"-laukinis) kamieną panaudojus citodukcijos donoru nustatyta, kad visi kilerinės virusinės dsRNR negalintys palaikyti citoduktantai pasižymi  $K^-R^-$  fenotipu. Tolesnė analizė parodė, kad [*KIL-d*] yra citoplazminiu keliu pernešamas veiksnys, kuris nebūtinai turi fenotipinę išraišką (Talloczy ir kt., 2000) .

Kita citoplazminiu keliu pernešamų genetinių veiksnių grupė apima [*PSI*] ir [*URE3*] prionus. Nustatyta, kad augimas esant guanidino hidrochlorido grįžtamai eliminuoja šiuos prionus, tačiau [*KIL-d*] veiksnio reversijos lygiui įtakos neturi. Geno, koduojančio šaperoninį baltymą Hsp104, suardymas arba perteklinė ekspresija įtakoja [*PSI*] praradimą. Ištyrus padidinto Hsp104 ekspresijos lygio poveikį [*KIL-d*] palaikymui nustatyta, kad ši ekspresija neturi įtakos [*KIL-d*] stabilumui (Talloczy ir kt., 2000).

[*KIL-d*] veiksnio grįžtamas atsiradimas ląstelėje yra lydimas įvairuojančių fenotipinių išraiškų ir primena [*PSI*] prioną, kuris pasižymi savybe pakartotinai atsirasti ląstelėje įvairuojančiais fenotipiniais požymiais, kurių išraiškos stiprumą lemia *SUP35* ekspresija. Pastarasis genas koduoja prioninį baltymą. Šaperoniniai baltymai dalyvauja baltymų susilankstyme ir ženkliai įtakoja konformacinius pokyčius, lemiančius prioninių darinių formavimąsi ląstelėje (Talloczy ir kt., 2000).

[*KIL-d*] veiksnys savo savybėmis ir pasireiškimu ląstelėje primena žinomus prioninius baltymus, todėl yra vadinamas "panašiu į prioną" veiksniu. Hipotezei, kad [*KIL-d*] yra prionas patvirtinti reikalinga detali geno, koduojančio prioninį baltymą, analizė. Specifinė [*KIL-d*] sąveika su

M dsRNR įgalina nagrinėti kriptinių ląstelės virusų įtaką žmogaus neurologiniams sutrikimams, sąlygotiems prionų (Talloczy ir kt., 2000).

## 2.7. Kilerinių mielių imuniškumo toksinams strategija

Kilerinis mielių *Saccharomyces cerevisiae* fenomenas siejamas su baltyminių toksinų, žudančių jiems jautrias taikines ląsteles, sinteze. Kilerinis poveikis pasireiškia receptorių sąveikos pasekoje. Šiuo metu intensyviausiai tyrinėjami yra K1 ir K28 toksinai. Kiekvienas kilerinis toksinas yra pirmiausiai sintetinamas preprotosino, kuris įsijungia į mielių sekretinį kelią, pavidalu. Sekretiniame kelyje subręsta iki citotoksiško  $\alpha/\beta$  heterodimero, kuris yra atpalaiduojamas nuo ląstelės ir išskiriamas į aplinką (Breinig ir kt., 2006).

Nors tiek K1, tiek K28 toksinams būdingas bendras letalus poveikis, tačiau toksinų veikimo mechanizmas yra skirtingas. K1 toksinas sutrikdo citoplazminės membranos funkcijas, o K28 patenka į taikinę ląstelę receptorinės endocitozės būdu, blokuoja DNR sintezę, veikia ląstelės ciklą G1/S fazėje ir lemia apoptotinio proceso pradžią (Breinig ir kt., 2006).

Kileriniai toksinai jungiasi prie pirminio receptoriaus mielių ląstelės sienelėje, o vėliau yra pernešami per plazminę membraną. Po pastarojo proceso kileriniai toksinai sąveikauja su antriniu receptoriumi. Glikozilfosfatidilinozitolio pagalba prijuntas Kre1 ląstelės baltymas yra K1 toksino receptoriaus plazminėje membranoje, o K28 toksino receptoriaus savybės dar tiriamos. Prisijungęs prie ląstelės sienelės paviršiaus, K1 toksinas plazminėje membranoje suformuoja katijonams laidžius jonų kanalus. K28 toksinas patenka į ląstelę ir per citozolį pasiekia savo galutinį tikslą-branduolį (Breinig ir kt., 2006).

Retrogradinė toksinų pernaša per endoplazminį tinklą, Goldžio aparatą ir iš jo priklauso nuo trumpos amino rūgščių sekos C-galiniame  $\beta$ -subvieneto domene, kuris įgalina toksiną pasiekti sekretinį kelią iš endosominių kompartmentų. Endoplazminiame tinkle  $\alpha/\beta$  heterodimeras nukreipiamas per citozolį veikiant Sec61 baltymui, kuris yra didysis endoplazminio tinklo pernašos komponentas. Sec61 baltymo veikimo pasekoje letalus signalas perduodamas į branduolį (Breinig ir kt., 2006).

Dabartiniu metu vyksta intensyvūs tyrimai, kuriais siekiama išaiškinti K28 toksiną produkuojančių ląstelių atsparumo savam toksinui mechanizmus. Nustatyta, kad K28 ląstelės paima toksiną ir perneša jį į citozolį. Imuniškumas K28 toksinui nepriklauso nuo ekstraląstelinio toksino

inhibicijos. Parodyta, kad preprotoksinas ir subrendęs toksinas yra išsidėstę K28 ląstelių citoplazmoje (Breinig ir kt., 2006).

Kilerinių mielių atveju funkcionalus imuniškumas yra esminė ląstelių išgyvenamumą apsprendžianti ypatybė, kadangi toksinai pilnai inhibuoja eukariotinių ląstelių gyvybines funkcijas. K28 toksino atveju imuniškumas toksinui atsiranda dėl aktyvaus sekretuojamo toksino nepatekimo į galutinės paskirties vietą arba dėl toksino inaktyvavimo tam tikrame sekrecinio kelio etape (Breinig ir kt., 2006).

Dideli  $\alpha/\beta$  heterodimero kiekiai K28 toksiną produkuojančių ląstelių citozolyje rodo, kad dimerinė subrendusio toksino konformacija yra stabilesnė. Tai leidžia manyti, kad K28 toksinai iš endoplazminio tinklo į citozolį pernešami analogiškoje  $\alpha/\beta$  heterodimero konformacinėje būsenoje. Remiantis šiais duomenimis galima teigti, kad K28 kilerinių ląstelių imuniškumas priklauso nuo subrendusio toksino inaktyvacijos, o toksino pašalinimas iš ląstelės mažiau įtakoja imuniškumą (Breinig ir kt., 2006).

Preprotoksino ir subrendusio toksino buvimas ląstelės K28 ląstelių citozolyje leidžia manyti, kad pagrindinis imuniškumo toksinui veiksnys yra sąveika tarp preprotoksino ir subrendusio  $\alpha/\beta$  heterodimerinio toksino.  $\alpha$  ir  $\beta$  subvienetus jungia  $\gamma$  seka. Nustatyta, kad nei  $\beta$ -subvienetas, nei  $\gamma$  seka neturi įtakos imniškumui prieš toksiną. Šis atradimas atitinka ankstesniųjų tyrimų duomenis, kurie teigia, kad  $\beta$ -subvienetas veikia kaip pavienė viduląstelinė pernašos pūslelė, transportuojanti  $\alpha$  toksiną į galutinės paskirties vietą. Imuniškumo užtikrinimui *in vivo* yra būtinas  $\alpha$ -subvienetas (Breinig ir kt., 2006).

Natvyvios struktūros preprotoksino  $\alpha$ -subvienetas yra C-galine jungtimi prijungtas prie  $\gamma$  sekos. Buvo bandoma nustatyti, ar padidinus C-galinės dalies ilgį padidės K28 ląstelių imuniškumas toksinui. Pašalinus  $\gamma$  seką pavyko sukonstruoti toksino liekaną, kurioje  $\alpha$ -subvienetas yra tiesiogiai prijungtas prie  $\beta$ -subvieneto. Šiuo atveju ląstelės pasižymėjo imuniškumu toksinui, o bandymu patvirtintas C-galinės dalies reikalingumas imuniškumo pasireiškime (Breinig ir kt., 2006).

Pakeitus K28 kilerinių mielių toksino  $\gamma$  seką K1 toksino  $\gamma$  seka nustatyta, kad K28 transformantai vykdo pilną ekspresiją nuo K1  $\gamma$  sekos bei pasižymi pilnu imuniškumu K28 toksinui. Pažymėtina, kad K1 ir K28 toksinų  $\gamma$  sekos nepasižymi tarpusavio homologija. Analogiškas reiškinys stebimas K1 kilerinio toksino veikime, šiuo atveju imuniškumą taip pat apsprendžia C-galinės dalis ir  $\alpha$ -subvienetas (Breinig ir kt., 2006).

Citozolinio preprotoksino ir subrendusio toksino kompleksų buvimas leidžia manyti egzistuojant būdą, kuriuo toksiną produkuojančios ląstelės palaiko citozolyje laisvo preprotoksino

koncentraciją, kuri reikalinga imuniškumo užtikrinimui subrendusio toksino sekretavimo į jautrią taikininę ląstelę metu. Nustatyta, kad minėtą preprotoksino koncentraciją palaikyti padeda ubkvitilimas bei proteosominis preprotoksino/toksino komplekso ardymas. Tokiu būdu laisvas preprotoksinas gali sąveikauti su  $\alpha/\beta$  heterodimerinio kompleksu (Breinig ir kt., 2006).

Išaiškinta, kad ubikvitilinto  $\alpha/\beta$  heterodimerinio komplekso proteosominis suardymas įgalina neubikvitilintą preprotoksina sudaryti kompleksus su kitomis K28 molekulėmis arba pereiti sekrecinį kelią, po kurio preprotoksinas virsta subrendusiu toksinu (Breinig ir kt., 2006).

Apibendrinant imuniškumo kileriniams toksinams strategiją K28 kamieno atžvilgiu galima teigti, kad atsparumą sąlygoja specifinė sąveika tarp toksiną produkuojančių ląstelių esančio preprotoksino ir sekrecinio kelio neperėjusiu toksino. Šios sąveikos pasekoje susidaro kompleksiniai preprotoksino/toksino dariniai, kurie vėliau yra ubikvitilunami ir suardomi proteosominiu veikimu. Tokiu būdu K28 ląstelės inaktyvuoja toksiną dar prieš citotoksiniam  $\alpha$ -subvienetui pasiekiant galutinį taikinį.

### 3. Medžiagos ir metodai

#### 3.1. Medžiagos

##### 3.1.1. Reagentai

|                                |                                                                                                                                |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BIOKAR DIAGNOSTICS, Prancūzija | mielių ekstraktas, vandeninis peptonas, agaras                                                                                 |
| FLUKA, Šveicarija              | GuHCl                                                                                                                          |
| LACHEMA, Čekija                | CaCl <sub>2</sub>                                                                                                              |
| MERCK, Vokietija               | metileno mėlis, NaCl, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x3H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O |
| OXOID, Anglija                 | peptonas                                                                                                                       |
| AB „VILNIAUS DEGTINĖ“, Lietuva | etanolis                                                                                                                       |
| PEAXIM, Rusija                 | D-gliukozė, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O                                             |
| ROTH                           | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                                                                |
| SERVA, Vokietija               | citrinų rūgštis (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> xH <sub>2</sub> O)                                               |

##### 3.1.2. Mielių kamienai

| Mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kamienai                                                | Santrumpa         | Šaltinis            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| $\alpha'$ 1-1JA-R <sup>+</sup> N – MAT $\alpha$ leu2 <sup>UAA</sup> [PIN+] [psi-] [URE3?]      | R <sup>+</sup> N  | D.Čitavičius, 2001  |
| $\alpha'$ 1-1JA-R <sup>+</sup> N-43/1 – MAT $\alpha$ leu2 <sup>UAA</sup> [PIN+] [psi-] [URE3?] | 43/1              | D. Čitavičius, 2001 |
| $\alpha'$ 1-1JA-NB13 <sup>-</sup> – MAT $\alpha$ leu2 <sup>UAA</sup> [PIN+] [psi-] [URE3?]     | NB13 <sup>-</sup> | D. Čitavičius, 2001 |

Šie kamienai ( $\alpha'$ 1-1JA-R<sup>+</sup>N,  $\alpha'$ 1-1JA-R<sup>+</sup>N-43/1 ir  $\alpha'$ 1-1JA-NB13<sup>-</sup>) yra gauti iš  $\alpha'$ 1-1JA (MAT  $\alpha$  leu2<sup>UAA</sup>) kamieno. Pastarasis išvestas iš 7A-P192 kamieno UV spindulių poveikyje.



### 3.1.3. Terpės-1L

#### YPD:

|                   |      |
|-------------------|------|
| D-gliukozė        | 20 g |
| peptonas          | 20 g |
| agaras            | 20 g |
| mielių ekstraktas | 10 g |

#### MD (minimali druskų terpė):

|                                                     |        |
|-----------------------------------------------------|--------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                        | 5 g    |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 0,9 g  |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$          | 0,5 g  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ | 0,23 g |
| $\text{NaCl}$                                       | 0,1 g  |
| $\text{CaCl}_2$                                     | 0,1 g  |
| gliukozė                                            | 20 g   |
| agaras                                              | 30 g   |

(Į išautoklavuotą terpę dedamas sterilus 50x  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tirpalas ir sterilus vitaminų tirpalas)

|                |                                     |
|----------------|-------------------------------------|
| 0.5M MD terpei | 10ml/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
| 1M MD terpei   | 20ml/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |

#### Kilerinio fenotipo testavimui naudota MB terpė:

|                                                                                |        |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|
| peptonas                                                                       | 5 g    |
| mielių ekstraktas                                                              | 5 g    |
| gliukozė                                                                       | 40 g   |
| citrinų rūgštis ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ ) | 10,6 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$                          | 35,3 g |
| Metileno mėlis                                                                 | 10 ml  |

Terpės autoklavuojamos 30 min prie 1 atm slėgio 120°C temperatūroje.

Metileno tirpalas ruošiamas 40x koncentracijos (0,3% metileno mėlio tirpinama 70% etanolyje, toliau skiedžiama distiliuotu vandeniu).

## **3.2. Metodai**

### **3.2.1. [PSI<sup>+</sup>] priono indukcija mielių ląstelių kultūroje**

30°C temperatūroje 48 valandas ant agarizuotos YPD terpės auginama mielių ląstelių kultūra. Pakartotinai persėjus, tomis pačiomis sąlygomis kultūra auginama dar 48 valandas. Pagaminamos ląstelių suspensijos, kurios 10<sup>7</sup> ląstelių/ml koncentracija užsėjamos ant agarizuotos MD terpės paviršiniu gazonu. Kultūra inkubuojama 11 parų 30°C temperatūroje.

### **3.2.2. Mielių auginimas tiriant prionų įtaką jų augimui**

Po priono indukcijos darbui atrinkti silpni ir stiprūs tiriamųjų kamienų prionizuoti variantai persėjami ant agarizuotų YPD ir MD terpių bei auginami 30°C temperatūroje 48 valandas. Pakartotinai persėjus, ant to paties tipo agarizuotų terpių, tomis pačiomis sąlygomis kultūra auginama dar 48 valandas. Vėliau kultūra užsėjama į skystą MD terpę (kultūros optinis tankis pradiniu laiko momentu yra 0,06-0,08) bei auginama 96 valandas matuojant optinį tankį. Mėginiai optinio tankio analizei imami kas 24 valandas. Mielių kultūrų ląstelių tankis nustatomas spektrofotometriškai, matuojant optinį tankį 600nm bangos ilgyje, t.y. OD<sub>600</sub>.

### **3.2.3. Kilerinio aktyvumo nustatymas**

Kileriniai kamienai formuoja skaidrias lizės zonas ant tiriamojo kamieno gazono. Pagal šias lizės zonas yra nustatomas kilerinis aktyvumas. Eksperimentų metu buvo naudojama MB terpė, kurios pH lygus 4,8, kadangi visų tipų kilerinių kamienų (K1, K2, K28) toksinai yra aktyvūs esant pH 4,8.

Į 10ml išlydytos MB terpės pridedama tiriamųjų mielių ląstelių suspensijos iki 10<sup>7</sup> ląstelių/ml. Terpė su tiriamųjų mielių ląstelių suspensija išpilstoma į Petri lėkštes. Paliekama sustingti. Skystoje MB terpėje pagaminamos kilerinių kamienų ląstelių suspensijos 10<sup>8</sup> ląstelių/ml, kurios spausdinamos ant

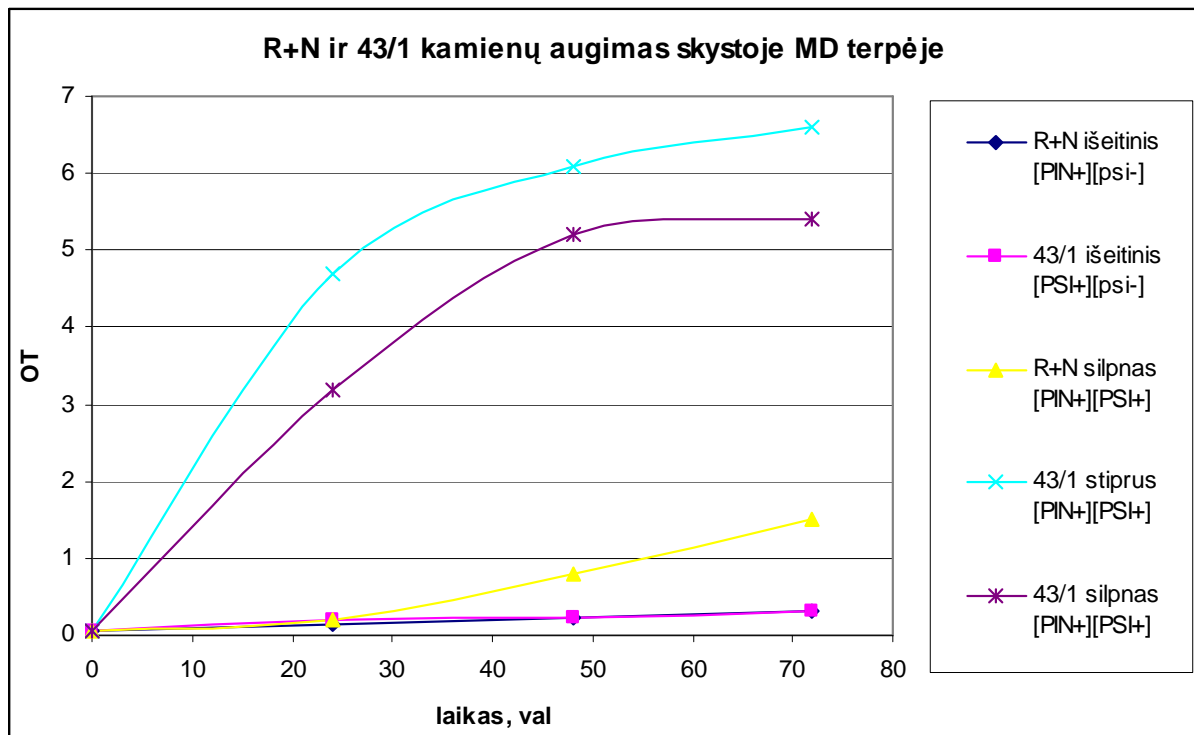
tiriamajo kamieno gazono. Lėkštelės 3-7 paras inkubuojamos 30°C temperatūroje. Aplink kilerinių kamienų kolonijas, išskiriančias toksiną, susidaro skaidrios lizės zonos, kuriose neauga toksinui jautraus kamieno ląstelės.

## 4. Rezultatai

### 4.1. R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų prioninių klonų augimo skystoje MD terpėje palyginimas

Išskirti ant agarizuotos terpės pagal kolonijų dydį silpni (mažos kolonijos) R<sup>+</sup>N ir stiprūs (didelės kolonijos) bei silpni 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] klonai buvo auginami skystoje MD terpėje 30°C temperatūroje 72 valandas. Tokiu pat būdu auginti ir išeitiniai pastarųjų kamienų variantai. Pradiniu laiko momentu kultūros optinis tankis buvo 0,06 (OT<sub>600</sub>=0,06). Kultūros mėginiai optinio tankio analizei buvo imami kas 24 valandas.

Tiriant R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] klonų optinį tankį iš grafiko matyti, kad skystoje MD terpėje didžiausią optinį tankį pasiekia stiprūs 43/1 kamieno [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] (1 pav.) klonai. Po 72 augimo valandų jų optinis tankis siekia 6.8.



1 pav. Prionizuotų ir išeitinių kamienų augimas.

Silpnųjų R<sup>+</sup>N ir silpnųjų 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] klonų augimas skystoje MD terpėje yra silpnesnis, pastarųjų klonų optinis tankis po 72 augimo valandų yra atitinkamai 1.8 ir 5.4. Nustatyta, kad neprionizuoti R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienai skystoje MD terpėje neauga. R<sup>+</sup>N kamieno išėtinio varianto optinis tankis po 72 augimo valandų yra 0.1, o 43/1 kamieno–0.14.

#### **4.2. Eliminantų, gautų iš R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantų, augimo skystoje MD terpėje analizė.**

Skystoje pilnoje MD terpėje R<sup>+</sup>N kamieno eliminantai auga geriau negu pusinėje MD terpėje. Po 72 augimo valandų pilnoje MD terpėje R<sup>+</sup>N kamieno eliminantų optinis tankis siekia 0,6-0,88, kai pusinėje MD terpėje pasiekiamas 0,48-0,6 optinis tankis.

Skystoje pilnoje MD terpėje 43/1 kamieno eliminantai auga geriau negu pusinėje MD terpėje. Po 72 augimo valandų pilnoje MD terpėje 43/1 kamieno eliminantų optinis tankis siekia 0,54-0,66, kai pusinėje MD terpėje pasiekiamas 0,32-0,44 optinis tankis.

Skystoje pilnoje MD terpėje silpnieji 43/1 kamieno eliminantai auga geriau negu pusinėje MD terpėje. Po 72 augimo valandų pilnoje MD terpėje pastarųjų eliminantų optinis tankis siekia 0,44-0,8 (pav.3, A), kai pusinėje MD terpėje pasiekiamas 0,36-0,5 optinis tankis (pav.3, B).

Apibendrinta R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų eliminantų augimo pilnoje ir pusinėje MD terpėse analizė buvo atlikta išvedus kiekvienos eliminantų grupės optinių tankių vidurkius 72 augimo valandų bėgyje.

Nustatyta, kad pilnoje MD terpėje geriausiai auga silpnieji R<sup>+</sup>N kamieno eliminantai, kurių atveju po 72 augimo valandų pasiektas optinis tankis yra 0,72. 43/1 kamieno stiprieji eliminantai pilnoje MD terpėje 72-ąją augimo valandą pasiekia 0,6 optinį tankį, o silpnieji 43/1 kamieno eliminantai-0,61 optinį tankį (4 pav.).

Pusinėje MD terpėje geriausiai auga taip pat silpnieji R<sup>+</sup>N kamieno eliminantai, jų optinis tankis 72-ąją augimo valandą yra 0,55. Stipriųjų 43/1 kamieno eliminantų optinis tankis pusinėje MD terpėje po 72 augimo valandų yra 0,38, o silpnųjų 43/1 kamieno eliminantų-0,42 (4 pav.).

Prionizuoti variantai skystoje MD terpėje auga žymiai geriau negu jų eliminantai. Prionizuoti R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų variantai po 72 augimo valandų pasiekia 6,8 optinį tankį, kai eliminantų optinis tankis tuo metu siekia tik 0,38-0,72.

### 4.3. Kilerinių toksinų poveikis R<sup>+</sup>N ir 43/1 tėviniams kamienams

Atlikus R<sup>+</sup>N ir 43/1 tėvinių [PIN<sup>+</sup>][psi<sup>-</sup>] kamienų atsparumo K1, K2 ir K28 kileriniams toksinams analizę nustatyta, kad tėviniai kamienai yra jautrūs visų trijų klasių kileriniams toksinams.

R<sup>+</sup>N tėvinis kamienas jautriausias K2 klasės toksinui, kurio poveikyje susiformuoja 3,6mm dydžio lizės zona. K28 ir K1 klasių toksinų poveikis yra silpnesnis: K28 toksino poveikyje susidaro 2mm dydžio lizės zona, o K1 toksino poveikyje-1,5mm lizės zona.

43/1 tėvinio kamieno atveju toksinų poveikis yra panašus. K2 toksinas ant tiriamojo kamieno gazono sudaro 3,2mm lizės zoną, K28 ir K1 toksinai atitinkamai 1,8 ir 1,1mm dydžio lizės zonas.

K2, K28 ir K1 toksinų poveikis R<sup>+</sup>N tėvinio kamieno atžvilgiu yra stipresnis negu 43/1 tėvinio kamieno atžvilgiu.

| Tiriamasis variantas     | Lizės zonos, mm |              |             |
|--------------------------|-----------------|--------------|-------------|
|                          | K2 toksinas     | K28 toksinas | K1 toksinas |
| Tėvinis R+N [PIN+][psi-] | 3.6             | 2            | 1.5         |
| Tėvinis 43/1[PIN+][psi-] | 3.2             | 1.8          | 1.1         |

#### 4.4. Kilerinių toksinų poveikis 43/1 kamieno [PIN<sup>+</sup>][PST<sup>+</sup>] variantams ir jų eliminantams

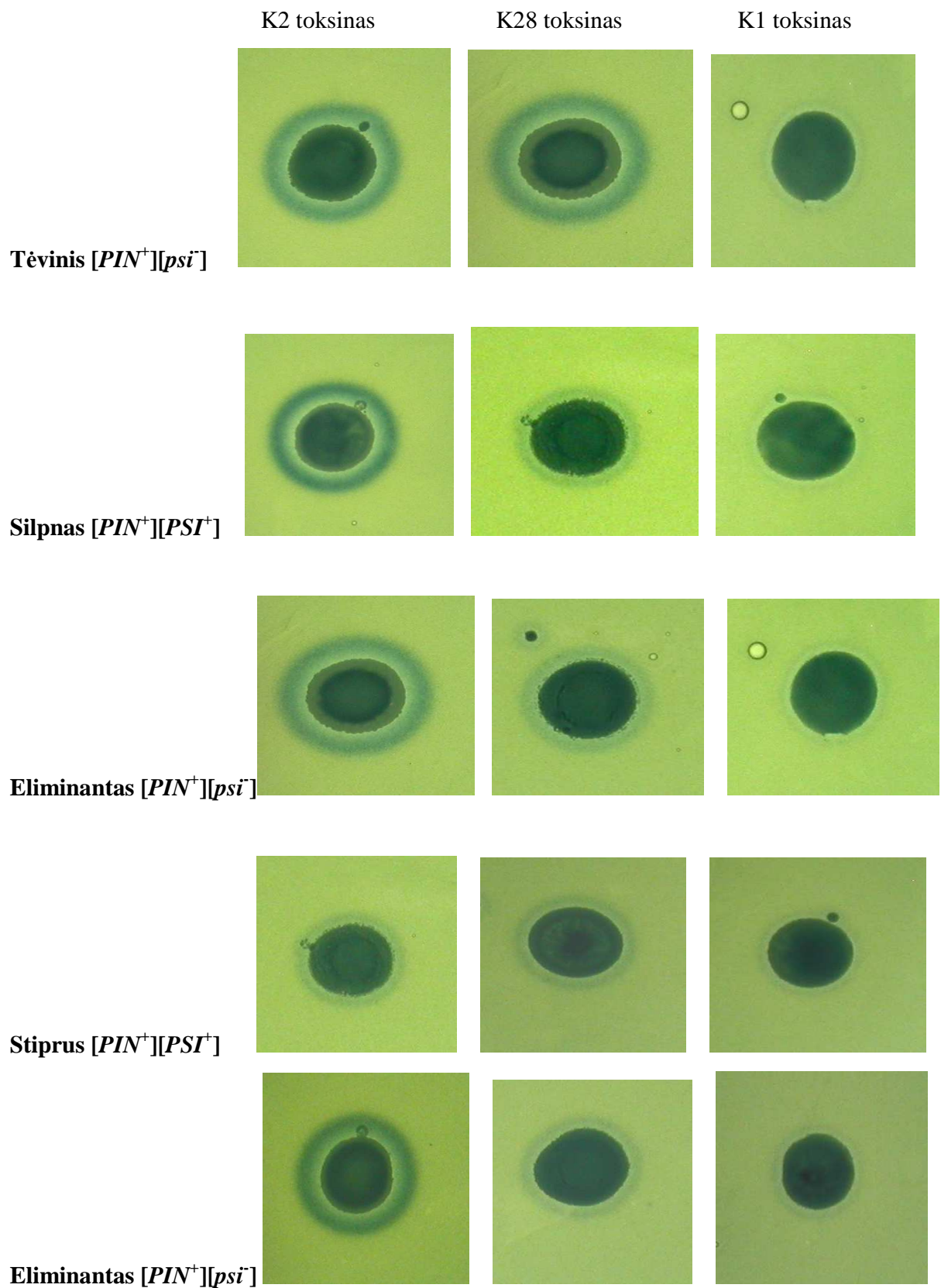
Silpno prionizuoto 43/1 kamieno atveju stipriausiai veikia K2 toksinas, kurio veikimo pasekoje susiformuoja 1.7mm dydžio lizės zona. K28 toksinui veikiant pastarąjį variantą susidaro 1mm dydžio lizės zona. K1 toksino poveikyje atsiradusios lizės zonos dydis neviršija 0.5mm (6 pav.).

Silpnų 43/1 kamieno eliminantų atveju didžiausias lizės zonas formuoja K2 toksinas, kurių dydis 2.4mm. K28 toksinas sudaro 1mm dydžio lizės zonas, o K1 toksinas-lizės zonas iki 1mm (6 pav.).

Stiprų prionizuotąjį 43/1 kamieno variantą labiausiai veikia K2 toksinas, kurio formuojama lizės zona yra 1.6mm dydžio. K28 toksino lizės zona stipraus prionizuoto 43/1 kamieno varianto gazonė yra 1.4mm dydžio, o K1 toksino atveju-0.5mm dydžio (6 pav.).

Stipriųjų 43/1 kamieno varianto eliminantų atveju K2 toksinas sudaro 2,1mm dydžio lizės zonas, K28 toksino lizės zona yra 0,9mm dydžio, o K1 toksino poveikyje susidaro 1mm dydžio lizės zona (6 pav.).

| Tiriamasis variantas                                             | Lizės zonos, mm |              |             |
|------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------|-------------|
|                                                                  | K2 toksinas     | K28 toksinas | K1 toksinas |
| Stiprus 43/1 [PIN <sup>+</sup> ][PSI <sup>+</sup> ]              | 1.6             | 1.4          | 0.5         |
| Stipraus 43/1 eliminantas [PIN <sup>+</sup> ][psi <sup>-</sup> ] | 2.1             | 0.9          | 1           |
| Silpnas 43/1 ]PIN <sup>+</sup> ][PSI <sup>+</sup> ]              | 1.7             | 1            | 0.5         |
| Silpno 43/1 eliminantas [PIN <sup>+</sup> ][psi <sup>-</sup> ]   | 2.4             | 1            | 1           |



6 pav. Kilerinių toksinų K2, K28 ir K1 poveikis 43/1 kamienui

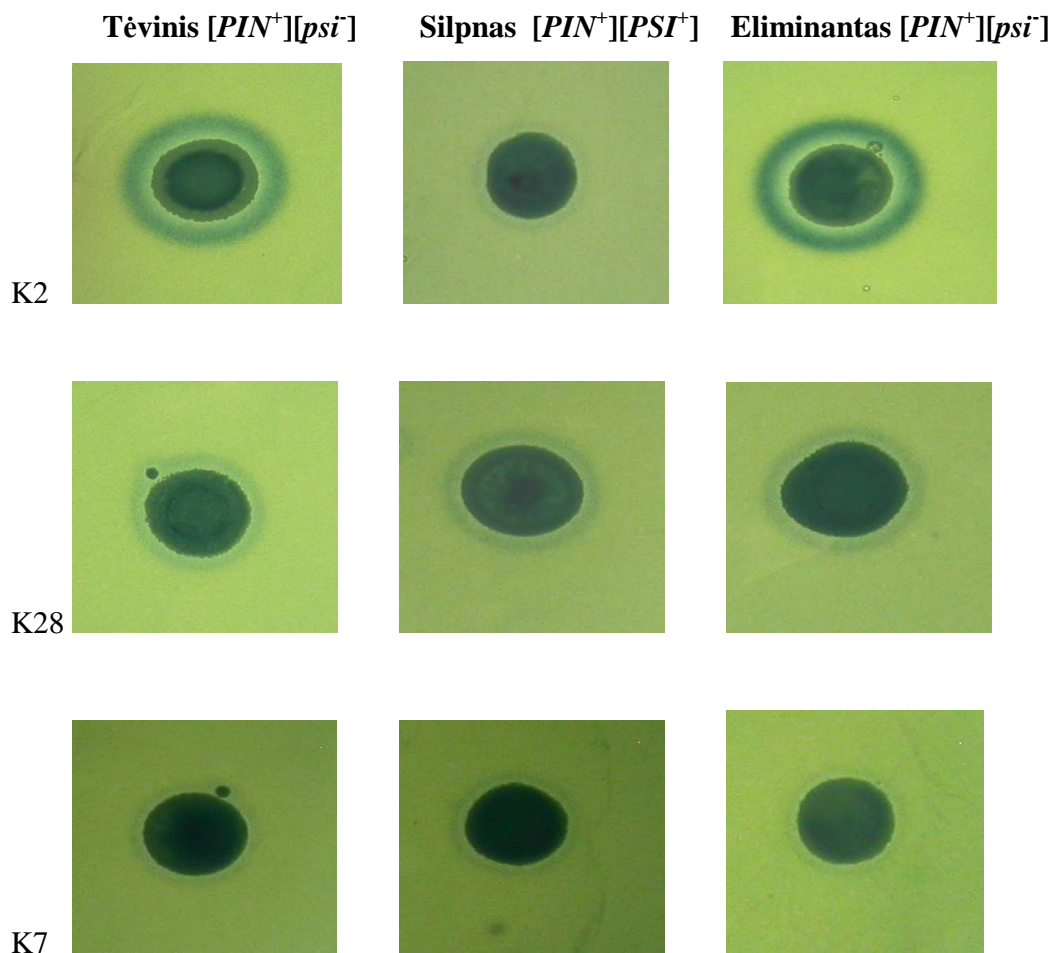


#### 4.5. Kilerinių toksinų poveikis R<sup>+</sup>N kamieno [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantams ir jų eliminantams

Silpno prionizuoto R<sup>+</sup>N kamieno atveju stipriausiai veikia K2 toksinas, kurio veikimo pasekoje susiformuoja 1.9mm dydžio lizės zona. K28 toksinui veikiant pastarąjį variantą susidaro 1mm dydžio lizės zona. K1 toksino poveikyje atsiradusios lizės zonos dydis neviršija 0.5mm (7 pav).

Silpnų R<sup>+</sup>N kamieno eliminantų atveju didžiausias lizės zonas formuoja K2 toksinas, kurių dydis yra 2.5mm. K28 toksinas sudaro 1mm dydžio lizės zonas, o K1 toksinas-lizės zonas iki 1mm (7pav.).

| Tiriamasis variantas                | Lizės zonos, mm |              |             |
|-------------------------------------|-----------------|--------------|-------------|
|                                     | K2 toksinas     | K28 toksinas | K1 toksinas |
| Silpnas R+N [PIN+][PSI+]            | 1,9             | 1            | 0,5         |
| Silpno R+N eliminantas [PIN+][psi-] | 2,5             | 1            | 1           |



7 pav. Kilerinių toksinų K2, K28 ir K1 poveikis  $R^+N$  kamienui

#### 4.6. K2 toksino poveikis $R^+N$ ir 43/1 kamienams

K2 toksinas tėvinių variantų atžvilgiu didesnes lizės zonas formuoja  $R^+N$  kamieno gazone. Pastarojo kamieno lizės zona K2 toksino poveikyje yra 3.6mm. 43/1 kamieno tėvinio varianto gazone M437 toksinas sudaro 3.2mm dydžio lizės zoną (8 pav).

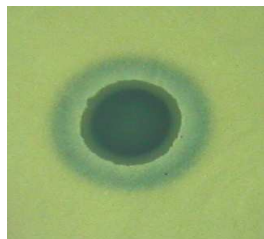
Prionizuotųjų  $R^+N$  ir 43/1 kamienų atžvilgiu K2 toksino poveikiui jautriausi yra  $R^+N$  kamieno [ $PIN^+$ ][ $PSI^+$ ] variantai. Silpnųjų prionizuotųjų  $R^+N$  kamieno variantų atžvilgiu K2 toksinas formuoja 1.9mm dydžio lizės zoną. Tuo tarpu 43/1 kamieno jautrumas šiam toksinui yra silpnasis-silpnieji ir stiprieji [ $PIN^+$ ][ $PSI^+$ ] variantai formuoja atitinkamai 1.7mm ir 1.6mm (8 pav.).

Eliminantų tarpe K2 toksinas stipriausiai veikia silpnųjų  $R^+N$  kamieno variantų eliminantus, kurių tarpe sudaromos 2.5mm dydžio lizės zonos. 43/1 kamieno atveju tiek stipriųjų, tiek silpnųjų

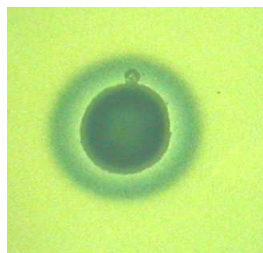
variantų eliminantų atžvilgiu K2 toksinas veikia panašiai-jo poveikyje sudaromos lizės zonos yra atitinkamai 2.1mm bei 2.4mm (8 pav.).

Remiantis šiais duomenimis galima teigti, kad K2 toksinas tėvinių  $[PIN^+][psi^-]$ , prionizuotųjų  $[PIN^+][PSI^+]$  bei eliminantų atžvilgiu stipriausiai veikia  $R^+N$  kamieną.

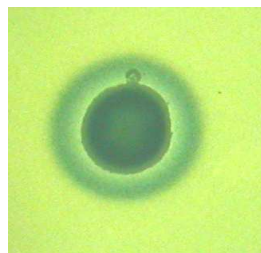
**$R^+N$  tėvinis  $[PIN^+][psi^-]$**



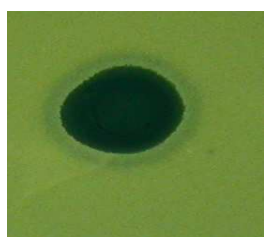
**43/1 tėvinis  $[PIN^+][psi^-]$**



**43/1 tėvinis  $[PIN^+][psi^-]$**



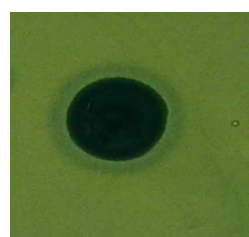
**Silpnas  $[PIN^+][PSI^+]$**



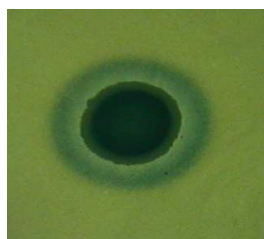
**Silpnas  $[PIN^+][PSI^+]$**



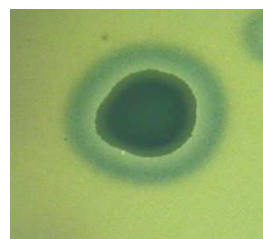
**Stiprus  $[PIN^+][PSI^+]$**



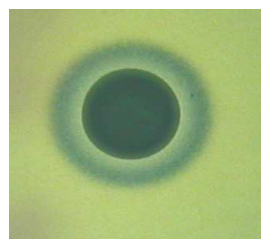
**Eliminantas  $[PIN^+][psi^-]$**



**Eliminantas  $[PIN^+][psi^-]$**



**Eliminantas  $[PIN^+][psi^-]$**



8 pav. K2 toksino poveikis  $R^+N$  ir 43/1 kamienams

#### 4.7. K28 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienams

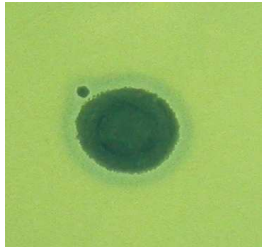
K28 toksinas tėvinių variantų atžvilgiu didesnes lizės zonas formuoja R<sup>+</sup>N kamieno gazonė. Pastarojo kamieno lizės zona K28 toksino poveikyje yra 2mm. 43/1 kamieno tėvinio varianto gazonė K28 toksinas sudaro 1.8mm dydžio lizės zoną (9 pav.).

Prionizuotųjų R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų atžvilgiu K28 toksino poveikiui 43/1 ir R<sup>+</sup>N kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantų jautrumas yra panašus. Silpnųjų prionizuotųjų R<sup>+</sup>N kamieno variantų atžvilgiu K28 toksinas formuoja 1mm dydžio lizės zoną. Tuo tarpu 43/1 kamieno silpnieji ir stiprieji [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantai formuoja atitinkamai 1mm ir 1.4mm (9 pav.).

Eliminantų tarpe K28 toksinas stipriausiai veikia silpnųjų R<sup>+</sup>N kamieno variantų eliminantus, kurių tarpe sudaromos 1mm dydžio lizės zonos. 43/1 kamieno atveju tiek stipriųjų, tiek silpnųjų variantų eliminantų atžvilgiu K28 toksinas veikia panašiai-jo poveikyje sudaromos lizės zonos yra atitinkamai 0,9mm bei 1mm (9 pav.).

Remiantis šiais duomenimis galima teigti, kad K28 toksinas tėvinių [PIN<sup>+</sup>][psi<sup>-</sup>] variantų atžvilgiu stipriausiai veikia R<sup>+</sup>N kamieną, prionizuotųjų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] atžvilgiu-stipriuosius 43/1 kamieno variantus, o eliminantų atžvilgiu tiek R<sup>+</sup>N, tiek 43/1 kamieno atžvilgiu šio toksino veikimas yra panašus.

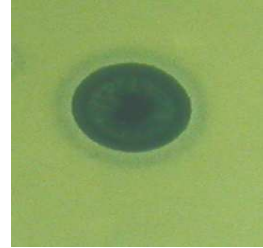
**R<sup>+</sup>N tėvinis [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**43/1 tėvinis [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



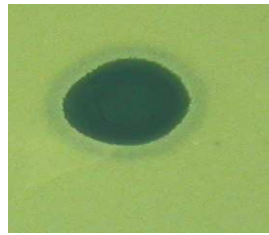
**43/1 tėvinis [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



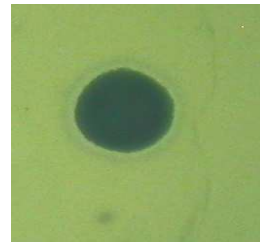
**Silpnas [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>]**



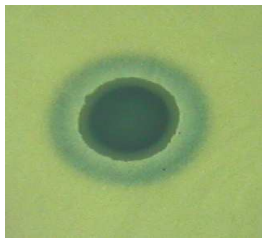
**Silpnas [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>]**



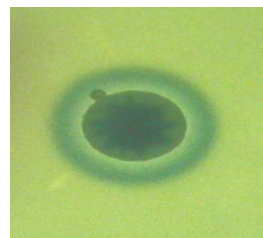
**Stiprus [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>]**



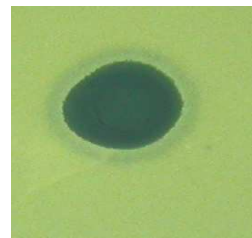
**Eliminantas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**Eliminantas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**Eliminantas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



9 pav. K28 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienams

#### 4.8. K1 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienams

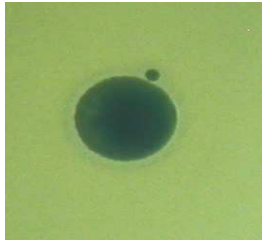
K1 toksinas tėvinių variantų atžvilgiu didesnes lizės zonas formuoja R<sup>+</sup>N kamieno gazone. Pastarojo kamieno lizės zona K1 toksino poveikyje yra 1.5mm. 43/1 kamieno tėvinio varianto gazone K1 toksinas sudaro 1.1mm dydžio lizės zoną (10 pav.).

Prionizuotųjų R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų atžvilgiu K1 toksino poveikiui 43/1 ir R<sup>+</sup>N kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantų jautrumas yra panašus. Silpnųjų prionizuotųjų R<sup>+</sup>N kamieno variantų atžvilgiu bei 43/1 kamieno silpnųjų ir stipriųjų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantų atžvilgiu K1 toksinas formuoja 0.5mm dydžio lizės zonas (10 pav.).

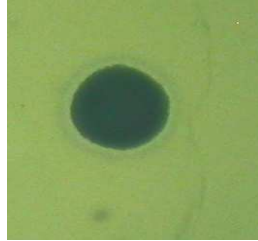
Eliminantų tarpe K1 toksinas vienodai veikia tiek silpnųjų R<sup>+</sup>N kamieno variantų eliminantus, tiek 43/1 kamieno tiek stipriųjų, tiek silpnųjų variantų eliminantų atžvilgiu. Jo poveikyje sudaroma lizės zona yra 1mm dydžio (10 pav.).

Remiantis šiais duomenimis galima teigti, kad K1 toksinas tėvinių [PIN<sup>+</sup>][psi<sup>-</sup>] variantų atžvilgiu stipriausiai veikia R<sup>+</sup>N kamieną, prionizuotųjų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] atžvilgiu-silpnuosius R<sup>+</sup>N kamieno ir stipriuosius bei silpnuosius 43/1 kamieno variantus, o eliminantų atžvilgiu tiek R<sup>+</sup>N, tiek 43/1 kamieno atžvilgiu šio toksino veikimas yra panašus.

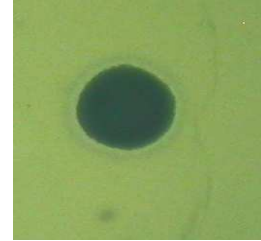
**R<sup>+</sup>N tėvinis [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**43/1 tėvinis [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**43/1 tėvinis [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**Silpnas [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>]**



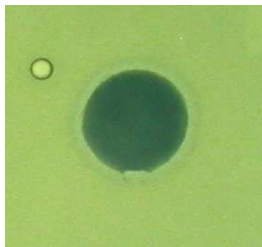
**Silpnas [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>]**



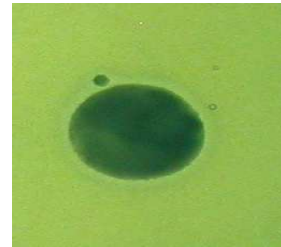
**Stiprus [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>]**



**Eliminantas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



**Eliminantas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**

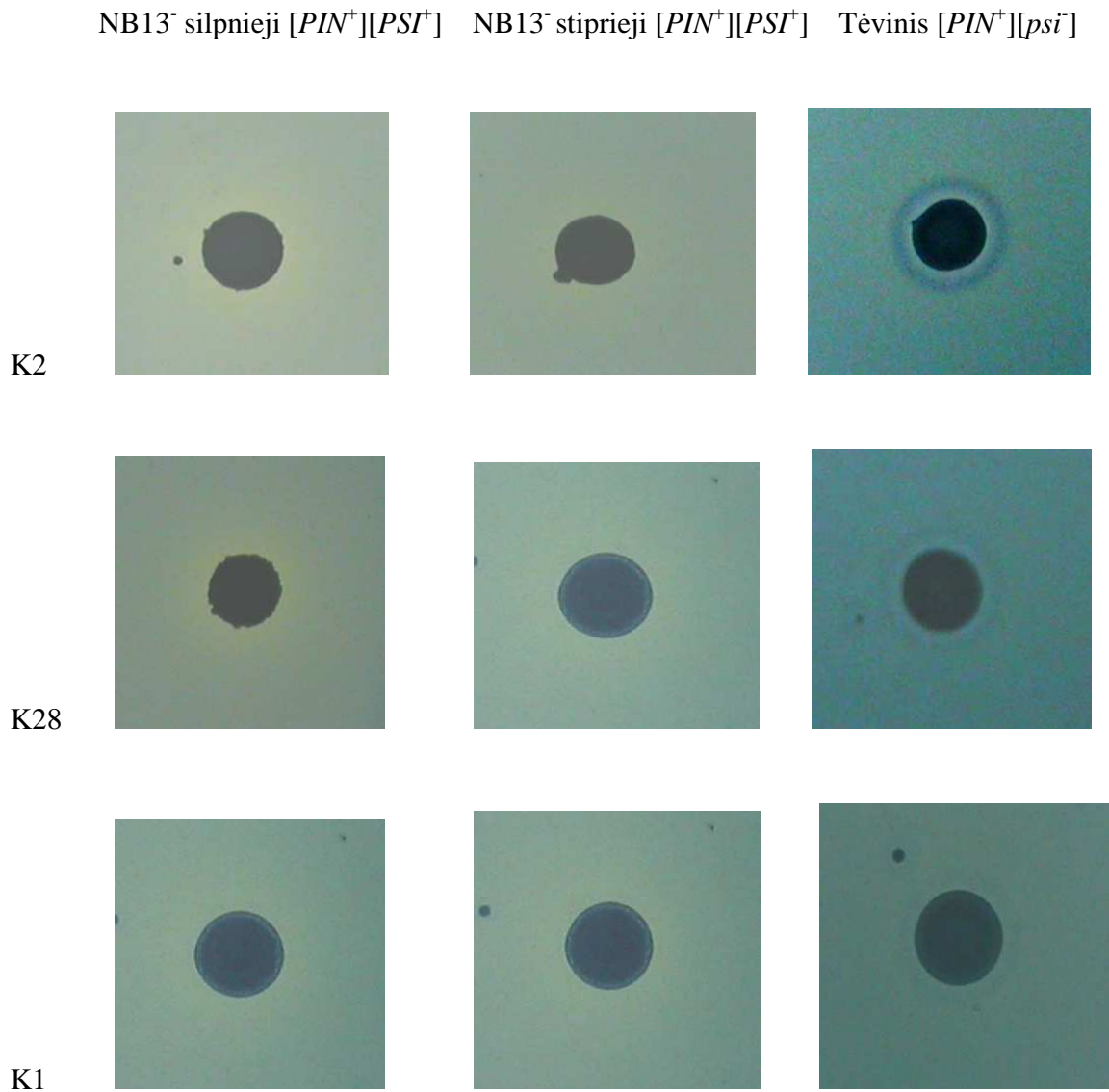


**Eliminantas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>]**



10 pav. K1 toksino poveikis R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienams

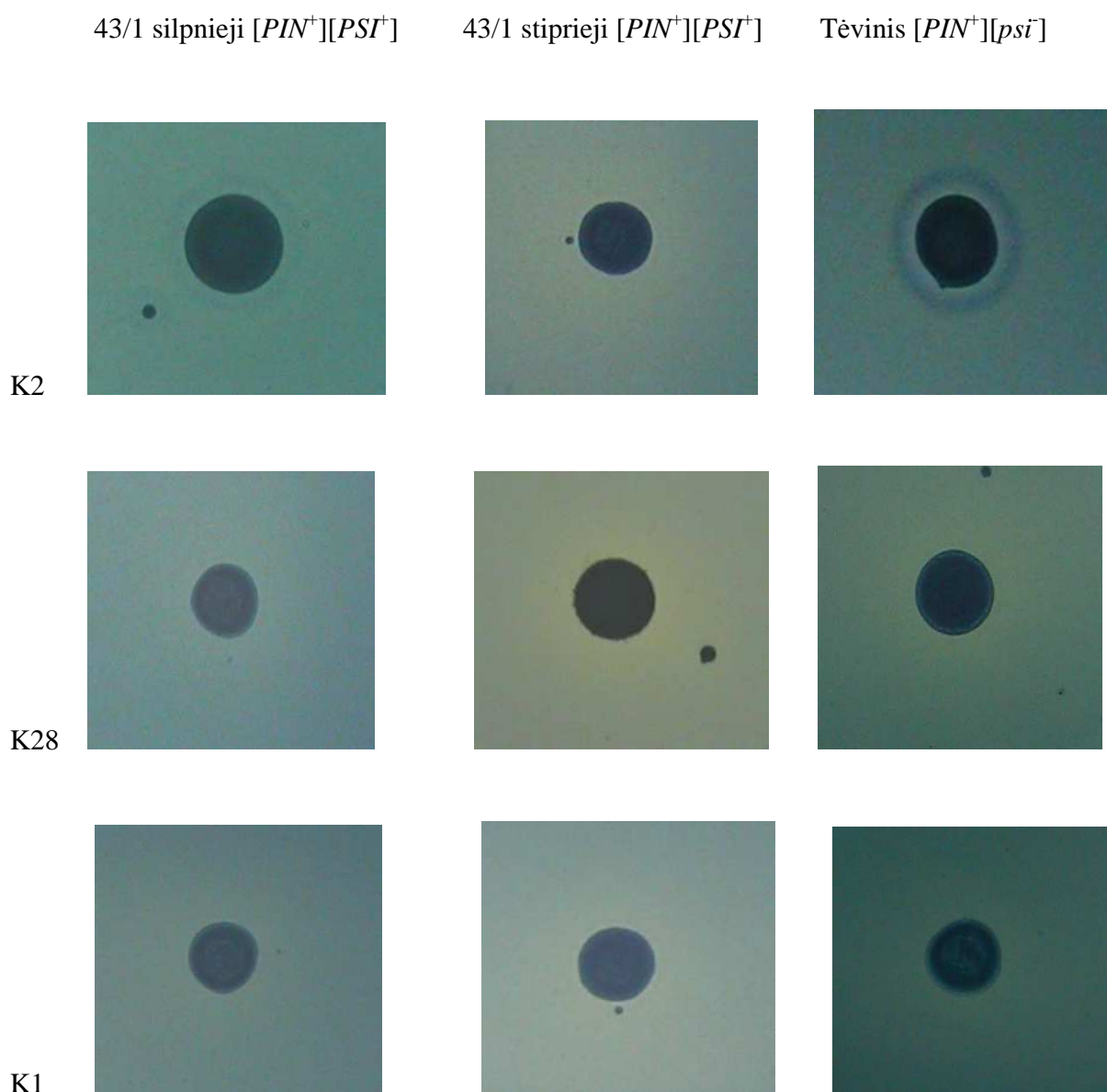
#### 4.9. Kilerinių toksinų poveikis NB13<sup>-</sup>, 43/1 ir R<sup>+</sup>N [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] kamienams



11 pav. Kilerinių toksinų poveikis NB13<sup>-</sup> kamieno [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] ir tėviniams variantams.

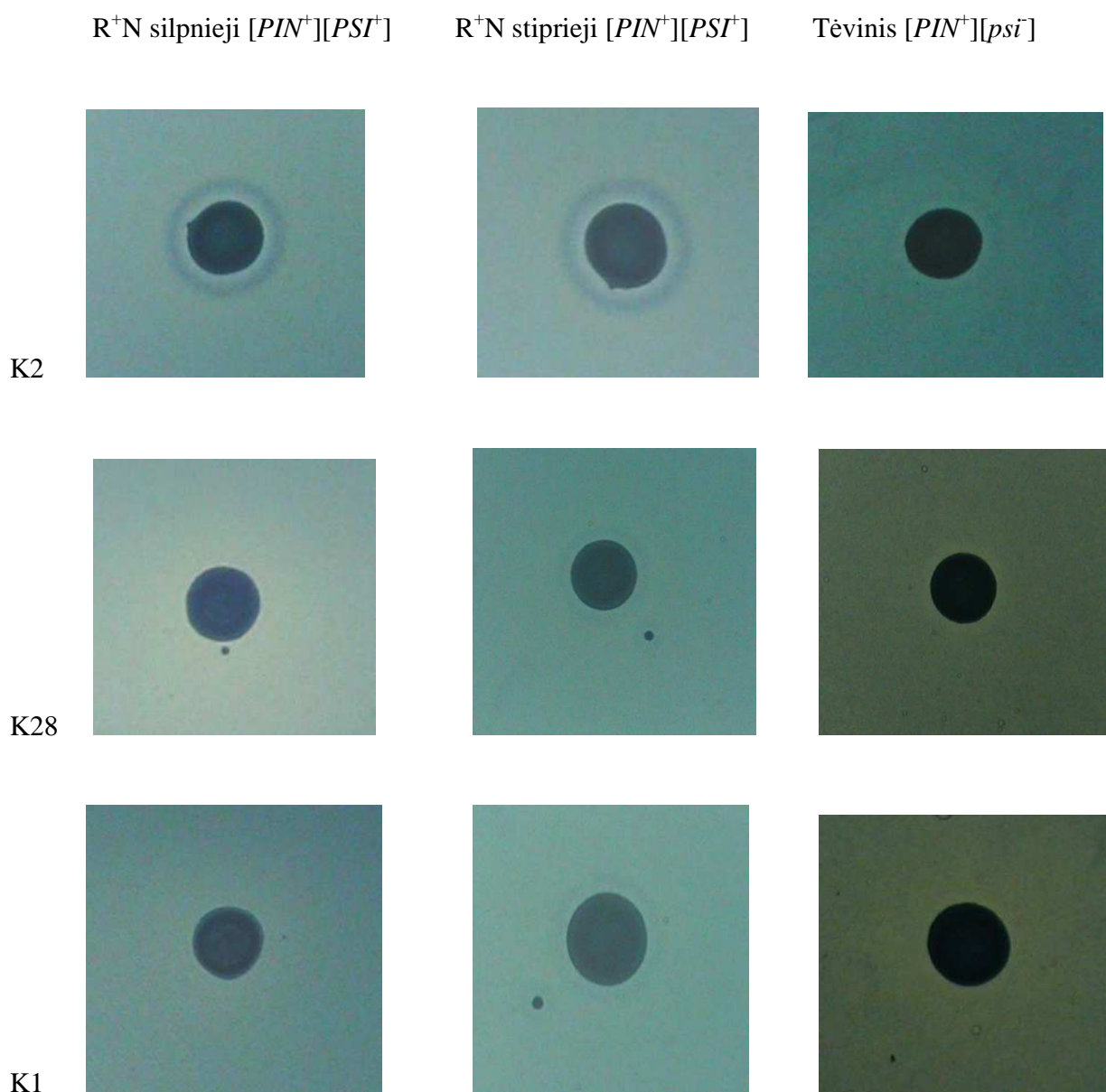
| Toksinas | NB13- lizės zonos,mm   |                        |                      |
|----------|------------------------|------------------------|----------------------|
|          | Silpnieji [PIN+][PSI+] | Stiprieji [PIN+][PSI+] | Tėvinis [PIN+][psi-] |
| K2       | neformuoja             | neformuoja             | 2,3                  |
| K28      | neformuoja             | neformuoja             | 1,6                  |
| K1       | neformuoja             | neformuoja             | 1                    |





12 pav. Kilerinių toksinų poveikis 43/1 kamieno [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>] ir tėviniams variantams.

| Toksinas | 43/1 lizės zonos, mm                                             |                                                                  |                                                                |
|----------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|          | Silpnieji [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] | Stiprieji [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] | Tėvinis [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>psi</i> <sup>-</sup> ] |
| K2       | 1,8                                                              | 1                                                                | 2,5                                                            |
| K28      | neformuoja                                                       | neformuoja                                                       | 0,5                                                            |
| K1       | neformuoja                                                       | neformuoja                                                       | 0,5                                                            |



13 pav. Kilerinių toksinų poveikis R<sup>+</sup>N kamieno [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>] ir tėviniams variantams.

| Toksinas | R+N lizės zonos,mm                                               |                                                                  |                                                                |
|----------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|          | Silpnieji [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] | Stiprieji [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] | Tėvinis [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>psi</i> <sup>-</sup> ] |
| K2       | 2,1                                                              | 2,4                                                              | 2,3                                                            |
| K28      | neformuoja                                                       | 1                                                                | 0,5                                                            |
| K1       | neformuoja                                                       | neformuoja                                                       | 0,5                                                            |

## Rezultatų aptarimas

Auginant R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų prionizuotus, tėvinius ir eliminantinius kamienus skystoje MD terpėje be leucino nustatyta, kad 43/1 kamieno prionizuoti variantai auga geriau negu R<sup>+</sup>N kamieno prionizuoti variantai. Tai rodo, kad aplinkoje nesant leucino 43/1 kamieno atveju nonsens kodonų supresijos efektyvumas yra geresnis. Manoma, kad ši savybė yra susijusi su prionizacija, kurios pasekoje 43/1 kamieno ląstelės įgyja geresnes adaptacines ypatybes. Neprionizuoti R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų variantai skystoje MD terpėje be leucino neauga.

Eliminantų augimas skystoje MD terpėje ženkliai skiriasi nuo prionizuotų variantų augimo. Tiek R<sup>+</sup>N silpnųjų prionizuotų variantų, tiek 43/1 kamieno stipriųjų ir silpnųjų prionizuotų variantų eliminantai skystoje MD terpėje be leucino auga labai silpnai lyginant su prionizuotais variantais. Tai rodo, kad prioninio būvio praradimas susilpnina nonsens kodonų supresiją, ko pasekoje eliminantų kultūros optinis tankis 72-ąją augimo valandą išlieka menkai pakitęs lyginant su pradiniu optiniu tankiu.

Atsparumo kilerinių mielių kamienų išskiriamiems toksinams tyrimais buvo parodyta, kad pradiniai R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienai yra jautrūs K1, K2 ir K28 kileriniams toksinams. Šių kamienų [PSI<sup>+</sup>] eliminantų atveju didžiausias lizės zonas suformuoja K2 klasės toksinas. Remiantis šiais duomenimis galima daryti išvadą, kad iš R<sup>+</sup>N ir 43/1 prionizuotų kamienų gautuose eliminantuose toksino jungimosi receptoriai nėra modifikuoti ir gali toliau sąveikauti su K2 toksinu.

Pažymėtina, kad R<sup>+</sup>N tėvinis kamienas yra jautresnis K2 toksinui negu 43/1 kamieno tėvinis variantas. Kileriniai toksinai prionizuotas kamienų formas [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] veikia skirtingai negu neprionizuotas [PIN<sup>+</sup>][psi<sup>-</sup>] formas: NB13<sup>-</sup>, R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienai įgyja atsparumą K1, K2 ir K28 toksinų poveikiui. Pažymėtina, kad R<sup>+</sup>N kamieno atveju K28 toksino poveikis priklauso nuo [PSI<sup>+</sup>] priono stiprumo.

Kadangi K1 ir K2 kileriniai toksinai turi vienodus receptorius ląstelės sienelės paviršiuje, o K28 toksino receptoriai yra kitas, galima daryti prielaidą, kad atsiradęs imuniškumas šiems toksinams rodo netiesioginį prionizacijos poveikį ląstelės sienelės komponentams. Kadangi tiek prionizuoti variantai, tiek eliminantai yra jautrūs K2 toksinui, tačiau K1 toksino atveju jautrumas yra itin silpnas, neatmetama galimybė, kad prionizacija gali būti susijusi su tam tikrus ląstelės sienelės struktūrinius pokyčius, susijusius su priono atsiradimu ir veikimu ląstelėje.

## Išvados

- 1) Parodyta, kad išskirti stiprūs ir silpni R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] variantai ir įvertintas jų augimas skystoje MD terpėje.
- 2) Parodyta, kad R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][PSI<sup>+</sup>] forma yra atsparesnė K1, K2 ir K28 kilerinių toksinų poveikiui negu R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienų [PIN<sup>+</sup>][psi<sup>-</sup>] variantai. R<sup>+</sup>N kamieno atveju K1 kilerinio toksino poveikis priklauso nuo [PSI<sup>+</sup>] priono stiprumo.
- 3) Įgyjamas atsparumas kileriniams toksinams rodo netiesioginį prionizacijos poveikį mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės sienelės komponentams.

## Santrauka

Šiame darbe buvo nustatyta [*PSI*<sup>+</sup>] priono įtaka K1, K2 ir K28 kilerinių toksinų poveikiui mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėms.

Atsparumo kilerinių mielių kamienų išskiriamiesiems toksinams tyrimais buvo parodyta, kad R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamienai yra jautrūs K1, K2 ir K28 kileriniams toksinams. Pažymėtina, kad R<sup>+</sup>N tėvinis kamienas yra jautresnis K2 toksinui negu 43/1 kamieno tėvinis variantas. Šių kamienų [*PSI*<sup>+</sup>] eliminantų atveju didžiausias lizės zonas suformuoja K2 klasės toksinas. Remiantis šiais duomenimis galima daryti išvadą, kad iš R<sup>+</sup>N ir 43/1 prionizuotų kamienų gautuose eliminantuose toksino jungimosi receptoriai nėra modifikuojami ir toliau sąveikauja su K2 toksinu.

Kileriniai toksinai prionizuotas kamienų formas [*PIN*<sup>+</sup>][*PSI*<sup>+</sup>] veikia skirtingai negu neprionizuotas [*PIN*<sup>+</sup>][*psi*<sup>-</sup>] formas: NB13<sup>-</sup>, R<sup>+</sup>N ir 43/1 kamieno atveju esant K2 toksinui lizės zonų nėra. NB13<sup>-</sup> atveju K1 ir K28 kilerinių toksinų poveikyje lizės zonų nėra, o R<sup>+</sup>N kamieno atveju K28 toksino poveikis priklauso nuo [*PSI*<sup>+</sup>] priono stiprumo. Esant [*PSI*<sup>+</sup>] prionui R<sup>+</sup>N kamienas yra atsparus K1 klasės kilerinių toksinų poveikiui.

## Summary

In this work the influence of  $[PSI^+]$  prion on the action of K1, K2 and K28 killer toxins over the cells of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was determined.

In studies of resistance to toxins secreted by killer yeast strains it was shown that  $R^+N$  and 43/1 strains are sensitive to K1, K2 and K28 killer toxins. It should be pointed out that the sensitivity of the parent  $R^+N$  strain to K2 toxin is higher than the sensitivity of 43/1 strain. In the case of isolated eliminants of these strains K2 toxin forms largest lysis zones. These observations lead to assumption that in the case of eliminants of the strains  $R^+N$  and 43/1, receptors are not modified and interact with K2 toxin.

The action of killer toxins over prionised  $[PSI^+][PSI]$  strains differ from non-prionised  $[PSI^+][psi^-]$  strains: in the case of NB13<sup>-</sup>,  $R^+N$  and 43/1 strains, K2 toxin does not form lysis zones. In the case of  $R^+N$  strain the influence of K28 toxin depends on the variant of  $[PSI^+]$  prion. In the presence of  $[PSI^+]$  prion,  $R^+N$  strain is resistant to the influence of K1 killer toxin.

## **Padėka**

Ypatingai nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui profesoriui D. Čitavičiui už visapusišką praktinę ir moralinę pagalbą šio magistrinio darbo rašymo metu.

Taip pat noriu padėkoti visiems Vilniaus Universiteto Gamtos mokslų fakulteto Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedros darbuotojams ir studentams už pagalbą ruošiant šį magistro darbą.

## Literatūros saraksts:

1. Bagriantsev S., Liebman S.W. 2004. Specificity of Prion Assembly *in Vivo*. *J. Biol.Chem.* Vol.279, No.49. 51042-51048.
2. Bousset L., Melki R. 2001. Similar and divergent features in mammalian and yeast prions. *Microbes and Infection* 4:461-469.
3. Breinig F., Sendzik T., Eisfeld K., Schmitt M.J. 2007. Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection.
4. Caughey B. 2001. Prion protein interconversions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356:197-202.
5. Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov 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.
6. Chernoff Y.O. 2001. Mutation processes at the protein level: Is Lamarck back? *Mutation Research* 488:39-64.
7. Derkatch I.L., Chernoff Y.O., Liebman S.W., Kushnirov V.V., Inge-Vechtomov S.G. 1996. *Genetics* 144:1375-1386.
8. Derkatch I.L., Bradley M.E., Hong I.Y., Liebman S.W. 2001. *Cell* 106:171-182.
9. Ganusova E.E., Ozolins L.N., Bhagat S., Newman Wegrzyn R.D., Sherman M.Y., Chernoff Y.O. 2006. Modulation of Prion Formation, Aggregation and Toxicity by the Actin Cytoskeleton in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 26.No.2, 617-629.
10. Ivanovska I., Hardwick M. 2005. Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *J. Cell. Biol.* Vol.170. 391-399.
11. Jung G., Jones G., Wegrzyn R.D., Masison D.C. 2000. A role of cytosolic Hsp70 in yeast [PSI<sup>+</sup>] prion propagation and [PSI<sup>+</sup>] as a cellular stress. *Genetics* 156:559-570.
12. King C.Y. 2001. *J. Moll. Biol.* 307:1247-1260
13. Kushnirov VV, Kryndushkin DS, Boguta M, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD.(2000). Chaperones that cure yeast artificial [Psi<sup>+</sup>] and their prion-specific effects. *Curr Biol.* 10(22):1443-1446.
14. Kyprianidou Ch., Tuite M.F. 2003. Protein-protein interactions in yeast prion propagation. (Presentation) *Dept. Of Biosciences.*
15. Kryndushkin D.S., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan D., Kushnirov V.V. 2003. Yeast [PSI<sup>+</sup>] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104. 2003. *J. Biol. Chem.* Vol. 287, No.49, 49636-49643.
16. Liebman S.W., Derkatch I.L. 1999. The yeast [PSI<sup>+</sup>] prion: making sense of nonsense. *J. Biol. Chem.* 274:1181-1184.



17. Meriin A.B., Zhang X., He X., Newman G.P., Chernoff Y.O., Sherman M.Y. 2002. Huntingtin toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell. Biol.* Vol.157, No.6, 997-1004.
18. Moriyama H., Edskes H., Wickner R.B.. 2000.*Moll. Cell. Biol.* 20:8916-8922
19. Nakayashiki T., Kutzman C.P., Edskes H.K., Wickner R.B. 2007. Yeast prions [URE3] and [PSI+] are diseases. *Nat. Acad. Of Sci.*
20. Narayan S., Walter S., Reif B. 2006. Yeast Prion-Protein, Sup35, Fibril Formation Proceeds by Addition and Substraction of Oligomers. *ChemBioChem* 2006, 7, 757-765.
21. Osherovich L.Z., Weissman J.S. 2001. *Cell* 106:183-194.
22. Parsell D.A., Kowal A.S., Singer M.A., Lindquist S..1994. *Nature* 372:475-478
23. Reiter J., Herker E., Madeo F., Schmitt M.J. 2005. Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell. Biol.* Vol. 168. No.3. 353-358.
24. Serio T.R., Lindquist S. 1999. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15:661-703
25. Sondheimer N., Lindquist S. 2000. Rnq1p: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5:163-172.
26. Sondheimer N., Lopez N., Craig E., Lindquist S.. 2001. *EMBO J.* 20:2435-2442.
27. Song Y., Wu Y., Jung G., Tutar Y., Eisenberg E., Greene L.E., Masison D.C. 2005. Role for Hsp70 Chaperone in *Saccharomyces cerevisiae* Prion Seed Replication. *Euk. Cell.* Vol.4., No.2, 289-297.
28. Taloczy Z., Mazar R., Georgopoulos., Ramos F., Leibowitz M.J. 2000. The [Kil-d] Element Specifically Regulates Viral Gene Expression in Yeast. *Genetics* 155. 601-609.
29. Wickner R.B. 1994. [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence of a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*:*Science* 264:566-569.
30. Wickner R.B., Taylor K.L., Edskes H.K., Maddelein M.L., Moriyama H., Roberts B.T. 2001.*Adv. Protein Chem.* 57:313-334.
31. Zhou P., Derkatch I.L., Patino M.M., Uptain S., Lindquist S., Liebman S.W. 1999. The yeast non-Mendelian factor [ETA+] is a variant of [PSI+], a prion-like form of release factor eRF3. *EMBO J.* 18:1182-1191.