

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė LASTAUSKIENĖ

**RAS/PKA SIGNALINIO KELIO KOMPONENTŲ ĮTAKA NATŪRALIU
TERPĖS RŪGŠTĖJIMU INDUKUOJAMAI *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE LĄSTELIŲ ŽŪČIAI**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, Biologija (01B)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2004–2008 metais Vilniaus universiteto, Gamtos mokslų fakulteto, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. **Donaldas Čitavičius** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Turinys

Santrumpos.....	5
ĮVADAS.....	7
Mokslinis naujumas.....	10
Darbo praktinė reikšmė.....	11
Gynimui pristatomi teiginiai.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1 Ras/PKA signalinis kelias.....	12
1.1.1 Ras/PKA signalinio kelio komponentai ir jų funkcijos mielių ląstelėse.....	13
1.1.2 Ras/PKA signalinio kelio taikiniai.....	19
1.1.2.1 Atsarginių maisto medžiagų kaupimo reguliacija.....	19
1.1.2.2 Streso atsako kontrolė.....	22
1.1.2.3 Ląstelės augimo ir proliferacijos kontrolė.....	24
1.1.2.4 Perėjimas į stacionariąją fazę.....	26
1.1.2.5 Sporuliacijos proceso reguliacija.....	27
1.2 pH atsako sistema.....	30
1.2.1 pH reguliacija <i>Aspergillus nidulans</i>	30
1.2.2 pH reguliacija mielėse <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.2.2.1 RIM signalinio kelio komponentai.....	34
1.2.2.2 Šarminio atsako kontrolės sistemos.....	35
1.3 Senėjimas ir apoptozė mielių ląstelėse.....	39
1.3.1 Mielių ląstelių senėjimas.....	39
1.3.2 Apoptozė mielėse.....	43
1.4 Bendros homeostazės palaikymas mielių ląstelėse.....	52
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	57
2.1 Mielių kamienai, plazmidės.....	57
2.2 Reagentai, rinkiniai.....	58
2.3 Terpės, tirpalai, buferiai ir kitos priemonės.....	59
2.4 Genetiniai metodai.....	62
2.5 Ras/PKA signalinio kelio fenotipų analizė.....	64
2.6 Ląstelių gyvybingumo analizė.....	65
2.7 Ląstelių žūties tipo nustatymas	67
3. DARBO REZULTATAI.....	69
3.1 Ras/PKA signalinio kelio pakitimus charakterizuojantys fenotipiniai požymiai.....	69
3.1.1 Eksperimentuose naudotų kultūrų fenotipų patikrinimas.....	70
3.1.2 Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaka kamienų augimui ir laipsniškam mitybinės terpės rūgštėjimui.....	72
3.2 Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas.....	77
3.2.1 Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas natūralaus laipsniško mitybinės terpės rūgštėjimo sąlygomis.....	77

3.2.2 Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas rūgštinio streso sąlygomis.....	83
3.3 Apoptozės fenotipų nustatymas pakitusio Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo kamienuose.....	90
3.3.1 Branduolių morfologijos pokyčių įvertinimas.....	90
3.3.2 Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymas.....	92
3.3.3. DNR fragmentavimo įvertinimas.....	96
3.3.4. Aktyvių kaspazių identifikavimas.....	99
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	103
IŠVADOS.....	120
Padėka.....	122
Literatūros sąrašas.....	123

SANTRUMPOS

ATP	adenozin-5'-trifosfatas
cAMP	ciklinis adenozin-3'5'-monofosfatas
CTD	C-galinis domenas
CLS	chronologinis senėjimas
PLŽ	programuota ląstelių žūtis
DAPI	diamino fenilindolas
DNR	deoksiribonukleorūgštis
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfatas
DTT	1,4-ditio-DL-treitolis
dUTP	deoksiuridintrifosfatas
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
FITC	fluorescuojantis izotiocianatas
GDP	guanozin-5'-difosfatas
GFP	žaliai fluorescuojantis baltymas
GPCR	G baltymo porinis receptorius
GTP	guanozin-5'-trifosfatas
GuHCl	guanidino hidrokloridas
YNB	mielių azoto bazė, SC terpės komponentas
iRNR	informacinė RNR
MAP	mitogenais aktyvinama proteinkinazė
OT	Optinis tankis
PBS	fosfatų-chloridų buferis
PEG	polietilenglikolis
PI	propidžio jodidas
PKA	proteinkinazė A
Ras/PKA	Ras (angl. from rat sarcoma) aktyvinamas signalinis kelias
rDNR	ribosominė DNR
RNR	ribonukleorūgštis
TOR	rapamicino signalinis kelias

TUNEL	terminalinės deoksinukleotidiltransferazės vykdomas DNR trūkių žymėjimas dUTP
UV	ultravioletiniai spinduliai
TPK	PKA katalizinis subvienetas
PDS	<i>cis</i> transkripcijos reguliacijos elementas
GEF	guanidino nukleotidų mainų veiksnys
STRE	streso atsako elementai
UAS	acetatui specifinis promotoriaus elementas
CEN	centromerinė seka
ROS	reaktyvusis deguonis
CLS	chronologinis senėjimas
PLŽ	programuota ląstelių žūtis
RLS	replikacinis senėjimas

Mitybinių terpių, buferių, mielių kamienų, plazmidžių santrumpos pateiktos medžiagų ir metodų skyriuje.

ĮVADAS

Nuolat kintanti aplinka yra pagrindinis veiksnys, kontroliuojantis mikroorganizmų augimą ir vystymąsi. Informacija apie aplinkos pasikeitimus yra greitai perduodama ląstelės vidinėms molekulėms, kad būtų generuojamas staigus atsakas. Evoliucijos eigoje organizmuose išsivystė signalinės sistemos, gebančios sujungti aplinkos signalus su ląstelės transkripcijos, translacijos ir kt. procesais. Viena iš tokių universalių signalinių sistemų yra Ras/PKA signalinis kelias. Ši sistema leidžia mielių ląstelėms reaguoti į aplinkoje esančius maisto medžiagų šaltinius ir įvairius stresinius veiksnius (Estruch, 2000). Jis kontroliuoja daugelį ląstelėse vykstančių procesų: ląstelių proliferaciją, sporuliaciją, senėjimą, žūtį, atsaką į stresą ir kitus (Thevelein, de Winde, 1999). Ras/PKA signalinis kelias yra konservatyvus ir aptinkamas visuose eukariotiniuose organizmuose, net ir prokariotuose egzistuoja atskiri jo komponentai. Evoliucinį konservatyvumą iliustruoja tai, kad mielių ląstelėse gali sėkmingai funkcionuoti ir tam tikri žmogaus Ras/PKA signalinio kelio komponentai (Sun ir kt., 1994). Todėl mielės tapo vienu pagrindinių modeliųjų organizmų bendruose Ras/PKA signalinės sistemos analizės eksperimentuose.

Kintanti aplinka įtakoja mielių elgseną, tačiau ir mielės keičia savo gyvenamąją aplinką išskirdamos įvairius toksinus, metabolitus, feromonus ir kitas medžiagas. Vienas iš pagrindinių aplinkos signalų, įtakojančių ląstelių fiziologiją, yra aplinkos pH (Penalva, Arst, 2004). Mielių ląstelėse į aplinkos pH reaguoja Rim101 signalinė sistema, kuri kartu su Ras/PKA reguliuoja tokius procesus kaip sporuliacija ir pseudohifinis augimas (Su, Mitchell, 1993). Ekstraląstelinės terpės rūgštėjimas lemia viduląstelinį rūgštėjimą, o tai sukelia mielių ląstelėms stresą ir taip aktyvina Ras/PKA signalinį kelią (Mollapour ir kt., 2006).

Ląstelinis streso atsakas yra evoliuciškai konservatyvus visuose gyvuose organizmuose. Pagrindinę rolę čia vaidina karščio šoko baltymų indukcija, kuri atsakinga ir už brendrą ląstelės streso atsaką, ir kitos molekulės, reikalingos apsaugai nuo streso. Streso atsako reguliacija apjungia tiek transkripcinius, tiek po-transkripcinius, tiek ir po-transliacinius mechanizmus (Estruch, 2000).

Streso poveikio pasekmė yra ląstelių augimo sulėtėjimas, gyvenimo trukmės trumpėjimas, augimo sustabdymas ar netgi žūtis. Pastaraisiais metais įrodyta, kad būtent Ras/PKA signalinis kelias reguliuoja ląstelės senėjimo procesą kaip atsaką į aplinkos pH (Burtner ir kt., 2009). Taigi mielių, kaip modelinio organizmo, panaudojimas žmogaus genų, reguliuojančių ląstelės senėjimą ir žūtį, tyrimuose vis plečiasi. Mūsų tyrimų kontekste mielės galėtų tarnauti modeliu, padedančiu suprasti su acidozėmis susijusių ligų eigą ir gydymo galimybes.

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra vertingos ne vien kaip aukštesniųjų eukariotų ląstelėse vykstančių molekulinį procesų tyrimo modeliniai organizmai. Jos taip pat plačiai naudojamos maisto ir alkoholio gamyboje jau daugelį amžių.

Visų mielių kamienų augimą lydi didesnis ar mažesnis mitybinės terpės rūgštėjimas. Vienose maisto pramonės šakose toks pH mažėjimas yra itin pageidaujamas, kitose – stengiamasi jį kiek įmanoma sumažinti (Dequin H., 2001). Žinoma, kad tam tikrų vyno rūšių gamyboje be kontroliuojamo rūgštėjimo yra taipogi reikalinga ir ląstelių žūtis apoptozės būdu. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių autolizė yra pagrindinis amino rūgščių, peptidų ir kitų molekulių, susijusių su putojančio vyno kokybe, šaltinis (Tabera ir kt., 2006). Būtent Ras/PKA signalinio kelio komponentai geba reguliuoti tiek mitybinės aplinkos pH kitimą, tiek ir ląstelių žūties būdo pasirinkimą. Taigi šių procesų kontrolė leistų smarkiai išplėsti mielių pritaikymo maisto ir alkoholio pramonėje ir, kaip jau buvo minėta, medicinoje ribas.

Darbo tikslas:

Įvertinti Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką natūraliu laipsnišku terpės rūgštėjimu indukuojamos ląstelių žūties raiškai mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

1. Sukurti modelinę sistemą, leidžiančią analizuoti Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką mielių ląstelių žūčiai natūraliai rūgštėjančioje mitybinėje aplinkoje ir rūgštinio streso sąlygomis.
2. Įvertinti Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką mielių ląstelių metaboliniam aktyvumui ir augimui natūraliai kintančio pH ir pastovaus pH sąlygomis.
3. Įvertinti Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką izogeninių mielių kamienų ląstelių gyvybingumui natūraliai jų augimo metu kintančio pH (YPD, SC terpės) ir pastovaus pH (YPD-MES, SC-MES) sąlygomis.
4. Įvertinti Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką mielių ląstelių žūties būdai – apoptozėi ir/arba nekrozei.

Mokslinis naujumas

Šio darbo mokslinį naujumą sudaro sisteminis Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtakos natūraliu terpės rūgštėjimu indukuojamos ląstelių žūties raiškai mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse įvertinimas:

- Nustatyta Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaka mitybinės terpės rūgštėjimui. Kelio aktyvumo sumažėjimą sąlygojanti *RAS2* geno delecija arba *PDE1* geno inaktyvinimas lemia intensyvią terpės rūgštėjimą, palyginus su laukinio tipo kamieniu.
- Pirmą kartą įvertinta Ras/PKA signalinio kelio įtaka mielių ląstelių gyvybingumui natūraliai rūgštėjančioje aplinkoje. Įrodyta, kad ląstelių gyvybingumas yra susijęs su mutacijomis Ras/PKA signalinio kelio komponentuose: *Ras2^{Val19}* ir $\Delta PDE2$ kamieniuose ląstelių gyvybingumas laipsniško rūgštėjimo sąlygomis yra patikimai mažesnis nei laukinio tipo kamieno. Kita vertus, *RAS* genų delecija ir fosfodiesterazės1 geno inaktyvinimas sąlygojo ženkliai didesnę mielių ląstelių gyvybingumą.
- Nustatyta Ras/PKA signalinio kelio ir kintančio aplinkos pH įtaka mielių ląstelių senėjimui. Įrodyta, kad pastovaus mitybinės aplinkos pH palaikymas ženkliai didina ląstelių augimo greitį ir pratęsia mielių ląstelių amžių. Nustatyta, kad sumažėjęs Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas lemia mielių ląstelių amžiaus ilgėjimą.
- Įrodyta, kad natūraliai mažėjančio pH sąlygomis Ras/PKA signalinis kelias įtakoja ląstelių žūties programos pasirinkimą. Šiame procese *RAS2* genas veikia kaip apoptozės, o *PDE2* genas – kaip nekrozės induktorius.

Gauti rezultatai leidžia išplėsti mielių, kaip modelinio organizmo, panaudojimo galimybę tiek senėjimo, tiek ir žūties eksperimentų kontekste aukštesniųjų eukariotų ląstelėse. Kontroliuojama ląstelių žūtis taip pat atveria galimybę Ras/PKA mutantinių kamienų panaudojimui biotechnologiniuose procesuose.

Darbo praktinė reikšmė

1. Įrodyta galimybė reguliuoti mitybinės aplinkos rūgštėjimą panaudojant Ras/PKA signalinio kelio komponentus.
2. Įrodyta galimybė reguliuoti mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių žūties būdą panaudojant inaktyvintus Ras/PKA signalinio kelio kontrolėje dalyvaujančius genus.
3. Įrodyta galimybė pritaikyti aplinkos rūgštinimo ir apoptozės/nekrozės indukcijos procesus maisto pramonėje, kur technologiniuose procesuose naudojamos mielės *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Išplečiama galimybė modeliuoti žinduoliuose vykstančius procesus ir tirti jų reguliaciją mielių ląstelėse.

Gynimui pristatomi teiginiai

1. Ras/PKA signalinio kelio komponentai, susiję su cAMP reguliacija, įtakoja mitybinės terpės rūgštėjimą.
2. Ras/PKA signalinio kelio komponentai reguliuoja mielių ląstelių gyvybingumą natūralaus laipsniško aplinkos rūgštėjimo ir rūgštinio streso metu.
3. Ras/PKA signalinio kelio komponentai lemia ląstelės žūties būdą natūralaus laipsniško aplinkos rūgštėjimo ir rūgštinio streso metu.

Darbo apimtis

Darbą sudaro 136 puslapiai. Jis suskirstytas į 7 skyrius: Įvadą, Literatūros apžvalgą, Medžiagas ir metodus, Rezultatus, Rezultatų aptarimą, Išvadas, Literatūros sąrašą. Jame yra 8 lentelės, darbas iliustruotas 38 paveikslais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Mikroorganizmų ląstelių ir aplinkos subalansuota tarpusavio sąveika yra esminiai veiksniai, padedantys ląstelėms palaikyti homeostazę. Ląstelių elgseną apsprendžia aplinka. Tuo pačiu, ląstelės, dėka savo sekretuojamų metabolizmo produktų, aktyviai įtakoja aplinkos pokyčius. Kartu su besikeičiančia, aplinka kinta ir ląstelės, kaip atskiros biologinės sistemos, funkcinavimas ir atskirų jos komponentų funkcionalumas. Todėl evoliucijos eigoje ląstelėse turėjo išsivystyti signalinės sistemos, kurios ne tik operatyviai reaguotų į aplinkos pokyčius, bet ir užtikrintų greitą ir adekvačią atsako reakciją – signalinė sistema turi užtikrinti biologinės sistemos integralumą.

Viena iš tokių plačiai eukariotiniuose organizmuose paplitusių sistemų (prokariotuose funkcionuoja šios sistemos atskiri elementai) yra Ras/PKA signalinė sistema.

1.1 Ras/PKA signalinis kelias

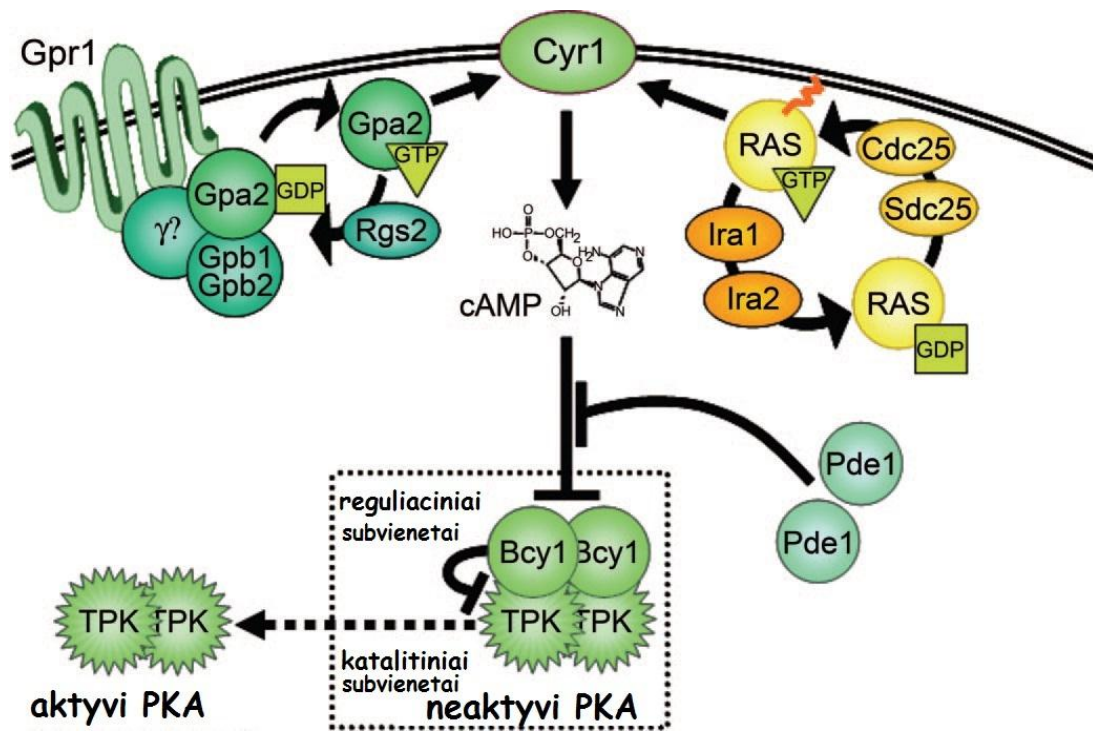
Ras/PKA signalinis kelias – tai viena pagrindinių ląstelės signalinių sistemų, suteikiančių ląstelėms informaciją apie ekstraląstelinius veiksnis. Ji reguliuoja ląstelės gyvybinius procesus pradedant eukariotiniais vienaląsčiais, baigiant žmogumi. Dėka antrinio informacijos nešėjo cAMP aktyvinamų proteinkinazės A katalizinių subvienetų vykstantys baltymų fosforilinimo procesai gali aktyvinti arba inhibuoti atskirus interaktomo komponentus ir taip užtikrinti ląstelės, funkcionalumą tam tikroje aplinkoje.

Ras/PKA signalinis kelias kontroliuoja:

1. Genetines sistemas, reguliuojančias ląstelių augimą ir vystymąsi;
2. Adekvačią ląstelių reakciją į stresines sąlygas;
3. Procesus, susijusius su ląstelės senėjimu ir žūtimi.

1.1.1. Ras/PKA signalinio kelio komponentai ir jų funkcijos mielių ląstelėse

Ras/PKA signalinis kelias suteikia ląstelei informaciją apie maisto medžiagų šaltinius ir streso veiksnius, esančius jos aplinkoje. Pirmajame signalo perdavimo etape yra indukuojama antrinio informacijos nešėjo cAMP sintezė. Ją iššaukia lengvai fermentuojamų anglies šaltinių atsiradimas aplinkoje ir viduląstelinis rūgštėjimas (Thevelein, 1994) (1 pav.). Informacija apie aplinkoje esančias gliukozės molekules ląstelei yra perduodama per gliukozės receptorių – Gpr1 baltymą. Tai 7 kartus veriantis membraną, dalyvaujantis Ras/PKA kelio indukcijoje baltymas. Jis sąveikauja su G baltymu, kurį mielėse koduoja *GPA2* genas.



1 pav. Mielių *S. cerevisiae* Ras/PKA signalinio kelio kontrolės modelis. Gliukozės signalas sukelia antrinio informacijos nešiklio cAMP sintezę. GTP surišantys G baltymai Ras ir Gpa2 nepriklausomai jungiasi prie adenilatciklazės Cyr1 ir aktyvina cAMP sintezę. cAMP taikiny yra PKA tetrameras. Reguliaciniai Bcy1 subvienetai yra susijungę su kataliziniais TPK neaktyvioje fermento formoje. cAMP jungiasi prie Bcy1 ir skatina kompleksą disociaciją, taip aktyvindamas fermentą. (Pagal Santangelo, 2006).

Tiesiogiai Gpr1 baltymo sąveika su ligandu – gliukozės molekule nėra patvirtinta (Kraakman ir kt., 1999; Thevelein, de Winde, 1999; Rolland ir kt., 2001). Tyrimai rodo, kad Gpr1 giminingumas gliukozei yra žemas: 20 – 30 mM gliukozės koncentracija yra reikalinga nuo Gpr1 priklausančiam cAMP signalui aktyvinti. Tai fiziologiškai atitinka mažiausią 20 mM gliukozės koncentraciją, kuri būtina mielių ląstelėms perjungti metabolizmą iš kvėpavimo į fermentaciją. Todėl tikėtina, kad receptorinė Gpr1-Gpa2 sistema yra skirta atpažinti būtent didelėms, optimalioms fermentacijai gliukozės koncentracijoms. Pagal šią savybę mielių receptorinė sistema skiriasi nuo žinomų, žinduoliuose esančių analogiškų sistemų, kurios paprastai pasižymi aukštu giminingumu ligandams ir neturi tokio išskirtinio specifiškumo (Rolland ir kt., 2000; Rolland ir kt., 2002; Versele ir kt., 2001).

Dar vienas komponentas, veikiantis GPCR sistemą, yra su membrana asocijuotas Rgs2 baltymas. Tai neigiamas Gpr1-Gpa2 reguliatorius. Rgs2 stimuliuoja Gpa2 baltymo GTP-azinį aktyvumą *in vitro*, nors tiksli jo funkcija dar nėra žinoma. Įrodyta, kad padidinta *RGS2* ekspresija užlaiko Ras/PKA signalo indukciją, o delecija – aktyvina (Versele ir kt., 1999). Rgs2 įtaka yra ryškesnė stacionarios fazės ląstelėse ir mutantuose, kuriuose žemas proteinkinazės aktyvumas. Tai reiškia, jog neigiamas Rgs2 poveikis Ras/PKA signalinei sistemai nepriklauso nuo proteinkinazės A grįžtamo ryšio inhibicijos, bet reguliuoja signalinį kelią kitu lygmeniu, esant specifinėms sąlygoms (Versele ir kt., 2001; Forsberg, Ljungdahl, 2001).

Be gliukozės katabolinės represijos Gpr1 ir Gpa2 baltymai dar yra svarbūs haploidinių ir diploidinių mielių filamentinio augimo reguliacijoje. Diploidų filamentinis augimas prasideda azoto arba aminorūgščių bado atveju, esant terpėje dideliame kiekiui fermentuojamo anglies šaltinio. Šiose sąlygose padidėja *GPR1* geno ekspresija (Forsberg, Ljungdahl, 2001). *GPA2* geno delecija slopina filamentinį augimą, tačiau šį efektą atstato padidintas cAMP lygis. Manyta, kad Gpa2 baltymas dalyvauja sistemoje, kuri atpažįsta azotą ir yra atsakinga už filamentinio augimo indukciją azoto bado atveju ir yra

reguluojama cAMP. Tačiau nėra duomenų, kad azoto badas mielėse kaip nors sumažintų cAMP kiekį (Thevelein, de Winde, 1999).

Ląsteles, kenčiančias anglies badą, perkėlus į terpę su gliukoze indukuojama greita cAMP sintezė. Po 1–2 min. nuo gliukozės atsiradimo terpėje, cAMP kiekis citoplazmoje padidėja 5–50 kartų, o dar per 20 min. nukrinta beveik iki bazinio lygmens. Bazinis cAMP lygmuo ląstelėje reikalingas užtikrinti gyvybinėms funkcijoms, įskaitant naują ląstelės ciklo pradžią ir mitozinį dalijimąsi. Šiek tiek aukštesnis lygmuo, kuris lieka po gliukozės indukcijos, reikalingas vykdyti fermentaciją, o aukštas trumpalaikis cAMP kiekis veiksmingai perjungia metabolizmą iš kvėpavimo į fermentaciją. Mielės gliukozę greitai fermentuoja iki etanolio, kuris stabdo kitų mikroorganizmų dauginimąsi. Tai yra vienas iš veiksmingų, teikiančių populiacijai adaptacinių privalumų. Ląstelių, augančių gliukozės terpėje, daugelis charakteristikų skiriasi nuo skaldančių nefermentuojamus anglies šaltinius kvėpavimo metu ir vykdančių gliukoneogenezę. Fermentuojančiose mielėse aktyvi glikolizė, jos dalijasi greičiau, yra jautrios aplinkos pokyčiams (karščio, šalčio, osmotinio slėgio, druskingumo ir pan.), sukaupia nedidelį atsarginių angliavandenių – glikogeno ir trehalozės – kiekį (Thevelein, 1994).

cAMP sintezės reakciją atlieka *CYR1* geno produktas – adenilatciklazė. Bazinis šio fermento aktyvumas priklauso nuo *RAS* genų veiklos. Tai adenilatciklazės aktyvumą didinantys reguliatoriai, kurie, kaip ir kiti membraniniai G klasės baltymai, Ras yra aktyvūs, prisijungę GTP, ir neaktyvūs, prisijungę GDP. Ras baltymuose GEF funkciją (guanidino nukleotidų mainus) atlieka Cdc25 ir jo funkcinis gyvybiškai nesvarbus homologas Sdc25. Šie du baltymai tarpusavyje gali formuoti homo- ir heterodimerus. Cdc25 yra reikalingas ne tik kelio indukcijos atveju, bet ir palaikant bazinį Ras baltymų aktyvumą. Surišto GTP hidrolizė Ras baltymuose gali vykti spontaniškai, arba ją atlieka GTP-azinių aktyvumą stimuliuojantys (GAP) baltymai. Mielėse Ras baltymų GAP yra *IRA1* ir *IRA2* genų produktai, tai neigiamai veikiantys Ras baltymų aktyvumą. Aktyvių Ras kiekis ląstelėje priklauso nuo dviejų konkuruojančių reakcijų: GDP/GTP pakeitimo reakcijos,

katalizuojamos Cdc25 ir Sdc25 baltymais iš vienos pusės, o GTP-azinės reakcijos, stimuliuojamos Ira baltymų iš kitos pusės. Siekiant išaiškinti naujus narius, kurie kontroliuoja Cdc25 funkciją, nustatytas HSP70 šeimos Ssa1 šaperonas, kuris per Cdc25 teigiamai veikia Ras ir viso Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą (Geymonat ir kt., 1998).

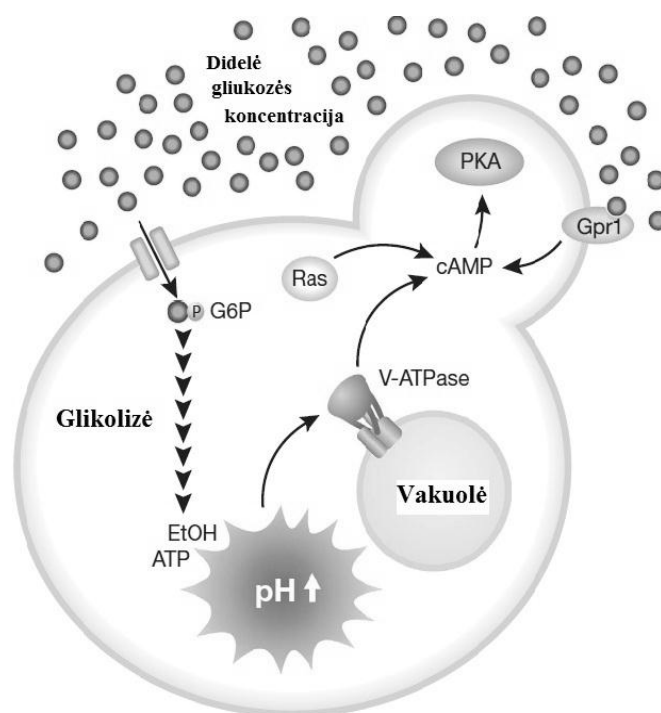
Ilgą laiką buvo manoma, kad būtent per *RAS1* ir *RAS2* genų produktus yra perduodamas gliukozės signalas mielėse. Šiuo metu eksperimentiškai patvirtinta, kad informacija apie gliukozės atsiradimą aplinkoje yra perduodama per gliukozės receptoriaus Gpr1 ir heterodimerinio G_{α} baltymo Gpa2 baltymo sistemą (Colombo ir kt., 1998). Nustatyta, kad viduląstelinis rūgštėjimas, o ne gliukozė Ras baltymuose padidina GTP/GDP santykį greičiausiai per Ira baltymus. Abiejų GEF faktorių – *CDC25* ir *SDC25* – genų delecija neturėjo įtakos rūgštėjimo sukeltam GTP/GDP santykio kitimui, tačiau abiejų *IRA* genų delecija šį santykį žymiai padidino, taip padidindama ir viduląstelinį rūgštėjimą (Colombo, 1998).

Adenilatciklazės stimuliavimui reikalingas dar vienas veiksnys – *CAP/SRV2* geno produktas. Tai bifunkcinis baltymas, sujungtas su adenilatciklaze. Jo N-galinė sritis yra atsakinga už adenilatciklazės aktyvinimą Ras baltymais. Galvojama, kad šis baltymas arba veikia kaip tarpininkas Ras-ciklazės sąveikoje, arba stabilizuoja šių dviejų baltymų fizinę sąveiką (Broach, 1991). C-galinė sritis dalyvauja visiškai kitokio pobūdžio reguliacijoje – citoskeleto formavime (Thevelein, 1992).

Antrinio informacijos nešėjo kiekis ląstelėje priklauso nuo dviejų konkuruojančių procesų: sintezės ir hidrolizės. Mielių ląstelėse aptinkamos dvi fosfodiesterazės, atliekančios cAMP hidrolizės funkciją. Pde1p pasižymi žemu substrato giminingumu, Pde2 – aukštu. Abu šie baltymai atlieka skirtingas funkcijas: Pde1 specifiškai reguliuoja cAMP kiekį po gliukozės ir žemo pH indukcijos, o Pde2 dalyvauja palaikant bazinį cAMP lygį ląstelėje (Ma ir kt., 1999). Manoma, kad Pde2 taip pat gali saugoti ląstelę nuo per didelio cAMP tiekimo iš aplinkos. Įrodyta, jog mutacijos, kurios leido mielėms įsisavinti augimo terpės cAMP, buvo būtent *PDE2* geno mutacijos (Thevelein, 1994).

cAMP, kaip antrinio informacijos nešėjo, funkcija ląstelėje – nuo cAMP priklausančios proteinkinazės A (PKA) aktyvinimas. Ši kinazė yra heterotetrameras, susidedantis iš dviejų reguliacinių subvienetų, koduojamų *BCY1*, ir dviejų katalizinių subvienetų, koduojamų trijų atskirų genų: *TPK1*, *TPK2* ir *TPK3*. Kai nėra cAMP, Bcy1 baltymas, kaip konkuruojanti molekulė, laiko surištus katalizinius subvienetus. Kai prie reguliacinių subvienetų prisijungia cAMP, Bcy1 inhibitorius išlaisvina katalizinius subvienetus, kurie savo ruožtu fosforilina gausius taikinius, toliau realizuojančius Ras/PKA signalinio kelio funkcijas (Versele ir kt., 2001; Thevelein, 1994; Thevelein, de Winde, 1999).

Į gliukozės signalą ląstelėje reaguoja keletas signalinių sistemų, tarp kurių yra ir PKA signalinis kelias. Išorinė gliukozė veikia per anksčiau minėtą GPCR sistemą, o vidinė gliukozė, būtinai fosforilinta, aktyvina PKA per *RAS* baltymus (Lemair ir kt., 2004, Gorner ir kt., 2002).



2 pav. pH kaip gliukozės signalas. Esant didelei gliukozės koncentracijai aplinkoje, efektyvus į ląstelės vidų nukreiptas glikolizinis srautas sąlygoja viduląstelinio pH didėjimą. Padidėjęs vidinis pH skatina V-ATPazės susirinkimą, dėl to prasideda cAMP sintezė ir PKA kelio aktyvinimas (Rubenstein, Schmidt 2010).

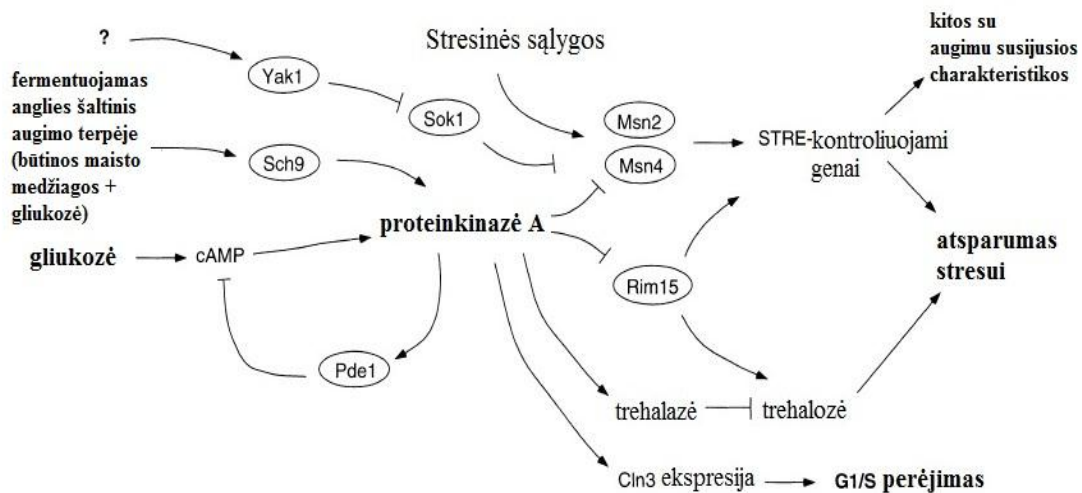
Naujausių tyrimų duomenys rodo, kad gliukozės signalas gali būti tiesiogiai verčiamas pH signalu ir ląstelės viduje, vakuolių ATPazės pagalba, kaip atsakas į gliukozę yra aktyvinamas PKA signalinis kelias. Tai, kad ląstelės jaučia glikozitinį srautą, pirmiausia buvo įrodyta kepenų β ląstelėse (Rubenstein, Schmidt 2010) (2 pav.). Kandidatais, tarnaujančiais gliukozės signalu, manoma, gali būti gliukozė-6-fosfatas ar fruktozės-2,6-bifosfatas (Muller ir kt., 1997). Ląstelėse, aktyviai fermentuojančiose gliukozę, viduląstelinis pH yra 7,2, tuo tarpu badaujančiose – pH 6,0. Tokios teorijos patvirtinimui reikalingi išsamesni tyrimai. Manoma, kad pH signalas ląstelėje gali veikti kaip antrinis gliukozės metabolizmo signalas eukariotuose (Rubenstein, Schmidt 2010).

Antrasis veiksnys, iššaukiantis Ras/PKA kelio indukciją, yra viduląstelinis citozolio rūgštėjimas. Rūgštėjimas kontroliuoja optimalų pH ir ATP lygį anglies bado atveju. Streso metu vyksta protonų nutekėjimas, kurį normaliomis sąlygomis atstato plazminės membranos H^+ ATPazė, kada energijos tiekimas yra pakankamas. Jeigu ląstelėje neužtenka ATP, H^+ ATPazė iš citoplazmos nepašalina pakankamai protonų, ir citozolis rūgštėja (Colombo ir kt, 1998). Viduląstelinio rūgštėjimo iššaukta cAMP sintezė, o kartu ir Ras/PKA kelio stimuliavimas šiuo atveju lemia atsarginių ląstelės angliavandenių, tokių kaip glikogenas ir trehalozė, skaldymą. Tai suaktyvina fermentacijos ir kvėpavimo procesus ir leidžia atstatyti ATP kiekį. Taigi cAMP signalas citozolio rūgštėjimo atveju atlieka apsauginę funkciją (Thevelein, 1991; 1992; 1994; Thevelein, de Winde, 1999; Colombo ir kt, 1998).

Ras baltymai reikalingi ne tik adenilatciklazės aktyvinimui, bet ir baziniam jos aktyvumui palaikyti. Badaujančių ląstelių reakcija į gliukozės atsiradimo ir viduląstelinio rūgštėjimo signalus yra labai greita, ir cAMP kiekis kelis kartus padidėja per keletą sekundžių. Įmanoma, jog adenilatciklazės ryšys su Ras padeda užtikrinti tokią greitą atsakomąją reakciją į stimuliavimą įprastais heterotrimeriniais G-baltymais. Kita vertus, tiesioginis Ras baltymų vaidmuo perduodant kitokius išorinius signalus taip pat nėra atmestas (Thevelein, de Winde, 1999; Thevelein ir kt., 2005; Roland ir kt., 2002).

1.1.2 Ras/PKA signalinio kelio taikiniai

Galutinė Ras/PKA signalinio kelio komponentų funkcija yra baltymų fosforilimas, kurį atlieka proteinkinazė A. PKA fosforilina baltymų aminorūgščių serino arba treonino liekanas ir taip keičia jų biologinį aktyvumą. Todėl Ras/PKA signalinio kelio veiklos taikinius galima sugrupuoti pagal PKA reguliuojamų biologinių procesų modulius mielių ląstelėse, tai: 1) atsarginių maisto medžiagų kaupimas ir jų kiekio reguliacija; 2) atsparumas stresui; 3) perėjimas į stacionariąją fazę; 4) augimas ir proliferacija; 5) sporuliacija (3 pav.).



3 pav. cAMP/PKA signalinio kelio taikiniai. Msn2 ir Msn4 yra pagrindiniai mielių ląstelių transkripcijos veiksniai, kontroliuojami PKA, tačiau pati STRE-kontroliuojamų genų streso indukcija nuo PKA nepriklauso. Rim15 proteinkinazė, kurią PKA inhibuoja, reikalinga daugeliui su stacionariąja faze susijusių charakteristikų. Cln3 ekspresija gali būti reguliuojama PKA ir pasirodo yra svarbi kontroliuojant G₁/S perėjimą. Sch9 proteinkinazė reikalinga PKA kinazės taikinių gliukozės ir azoto efektams. Tiksliai jos sąveika su PKA nėra aiški. Yak1 ir Sok1 proteinkinazės panašiai veikia antagonistiskai su PKA. Žemo giminingumo cAMP fosfodiesterazė Pde1 yra inaktyvinama PKA ir vaidina vaidmenį mažinant antagonistą indukuojamą cAMP signalą (Thevelein, de Winde, 1999).

1.1.2.1 Atsarginių maisto medžiagų kaupimo reguliacija

Vieni iš svarbiausių PKA substratų yra metabolizmo fermentai dalyvaujantys anglies katabolinėje represijoje. Katabolinės represijos metu proteinkinazė A reguliuoja gliukoneogenezės ir fermentacijos baltymų aktyvumą (Fraenkel, 1986). Nerepresuotoms ląstelėms pridėjus gliukozės,

PKA fosforilina fruktozės-1,6-bifosfatą ir ją inaktyvina (vyksta gliukoneogenezės inhibicija) ir aktyvina fosfofruktokinazę (stimuliuojama fermentacija) (Goncalves, Planta, 1998). Be to gliukozė indukuoja dar ir šiuos glikolizinio kelio fermentus: piruvato dekarboksilazę, alkoholdehidrogenazę I, enolazę II ir piruvato kinazę. Plazminės membranos H⁺-ATPazę, kurią koduoja *PMA1* genas, taip pat fosforilina PKA. Taip stimuliuojamas metabolizmas perjungiant ląsteles iš kvėpavimo į fermentaciją (Rao ir kt., 1993).

Atsarginių angliavandenių kaupimas susijęs su ląstelės augimo greičio lėtėjimu, kuris savo ruožtu priklauso nuo Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo: sumažėjęs Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas lemia G1 fazės ilgėjimą. Kuo ilgesnė yra G1 fazė, tuo daugiau laiko sukaupti didesnes glikogeno ir trehalozės atsargas (Sillje ir kt., 1999).

Glikogeną ląstelės pradeda kaupti, kol terpėje yra gausu mitybinių šaltinių – dar prieš diauksijos pradžią, o panaudoja stacionariosios fazės pabaigoje, kai anglies šaltiniai yra išnaudoti. Glikogeno sintezėje ir panaudojime dalyvauja du fermentai: glikogensintazė (*GSY1* ir *GSY2*) sintetina glikogeną, o glikogenfosforilazė (*GPH1*) – skaldo. Glikogeno kaupimo pradžioje yra aktyvinama sintezės genų transkripcija ir defosforilinant inhibuojama glikogenfosforilazė. Fosforilazę fosforilina nuo cAMP priklausoma ir nepriklausoma proteinkinazės. Fosforilazės aktyvi forma yra fosforilinta, neaktyvi – defosforilinta. Sintezės metu – atvirkščiai: aktyvi forma yra defosforilinta, neaktyvi – fosforilinta.

Snf1 proteinkinazė teigiamai veikia genų ekspresiją ir neigiamai veikia nuo ciklinų priklausančią proteinkinazę Pho85. Pho85 gali jungtis su ciklinu ir reguliuoti potencialių transkripcijos veiksnių lokalizaciją branduolyje, kurie atsakingi už *GSY2* geno ekspresiją ir tokiu būdu sukuria naują reguliacijos grandį. Proteinkinazės PKA ir Snf1 veikia antagonistiskai (PKA – teigiamai, Snf – neigiamai), fosforilindamos glikogensintazę ir glikogenfosforilazę, taigi keičia fermentų aktyvumą. Kol ląstelei pakanka maisto medžiagų, PKA aktyvumas kartu su Pho85 stabdo glikogeno ir trehalozės kaupimą genetiniame ir fermentiniame lygmenyje. Kada maisto medžiagos išnaudojamos, sumažėja

Ras/PKA kelio aktyvumas ir nebevyksta genų represija. Snf1 proteinkinazė šiuo atveju inaktyvina Pho85. Šios koordinuotos kontrolės pasekoje labai smarkiai išauga glikogeno kiekis (Francois, Parrou, 2001).

Trehalozė, kaip atsarginis angliavandenis, pasižymi ir unikaliomis apsauginėmis savybėmis. Trehalozė saugo membranas nuo išdžiūvimo, tai streso sąlygose padeda išlaikyti membranų integralumą ir biologines funkcijas. Taip pat trehalozė geba pašalinti vandenį nuo baltymų paviršiaus ir tokiu būdu apsaugoti baltymus nuo denatūracijos streso metu. Didelis trehalozės kiekis neleidžia denatūruotiems baltymams agreguotis ir keičia šaperonų veiklos sąlygas (Singer, Lindquist, 1998). Trehalozės sintezė prasideda, kai aplinkoje pradeda trūkti lengvai fermentuojamų anglių šaltinių, stacionariosios fazės pabaigoje. Jos panaudojimas vyksta tada, kai aplinkoje nebelieka lengvai prieinamų angliavandenių, ir prasideda antrinis kultūros augimas įsisavinant alternatyvius anglių šaltinius.

Trehalozės sintezėje dalyvauja trehalozės sintazės kompleksas trehalozės-6-fosfato sintazė Tps1, kurią indukuoja fruktozės-6-fosfatas, trehalozės-6-fosfato fosfatazė Tps2, Tps3, manoma, yra reguliacinis subvienetas. Trehalozės hidrolizę vykdo trehalazės: neutralią trehalazę koduoja *NTH1* ir papildomas genas *NTH2*. Abu šie genai veikia derepresuotose ar stresą patyrusiose ląstelėse. Rūgštinę vakuolių trehalazę koduoja *ATH1* genas. Ši trehalazė reikalinga naudojant trehalozę, kaip anglių šaltinį, ekstraląstelinės trehalozės skaldymui (Francois, Parrou, 2001).

NTH1 reguliacija priklauso nuo Msn2 ir Msn4 transkripcijos veiksnių, reguliuojamų Ras/cAMP signalinio kelio. Msn2 ir Msn4 reguliuoja trehalozės sintezės genus transkripcijos lygmenyje, per juose esančius STRE elementus. Ras/cAMP signalinio kelio aktyvumas slopina trehalozės sintezės genų ekspresiją neleisdamas transkripcijos veiksniams patekti į branduolį. Tokios reguliacijos metu kinta ir kitų fermentų kiekis, jų aktyvumas, substratų kiekis. Angliavandenių kaupimas yra integruota transkripcijos ir fermentinių sistemų reguliacijos sistema.

Be glikogeno ir trehalozės kaupimo, Ras/PKA signalinis kelias dalyvauja fosforilinant baltymus, atsakingus už anglies ir lipidų metabolizmą. Tai tokie fermentai, kaip izocitratliazė, fosfatidilserino sintazė ir fosfatidato fosfatazė (Carman, 1997; Francois, Parrou, 2001).

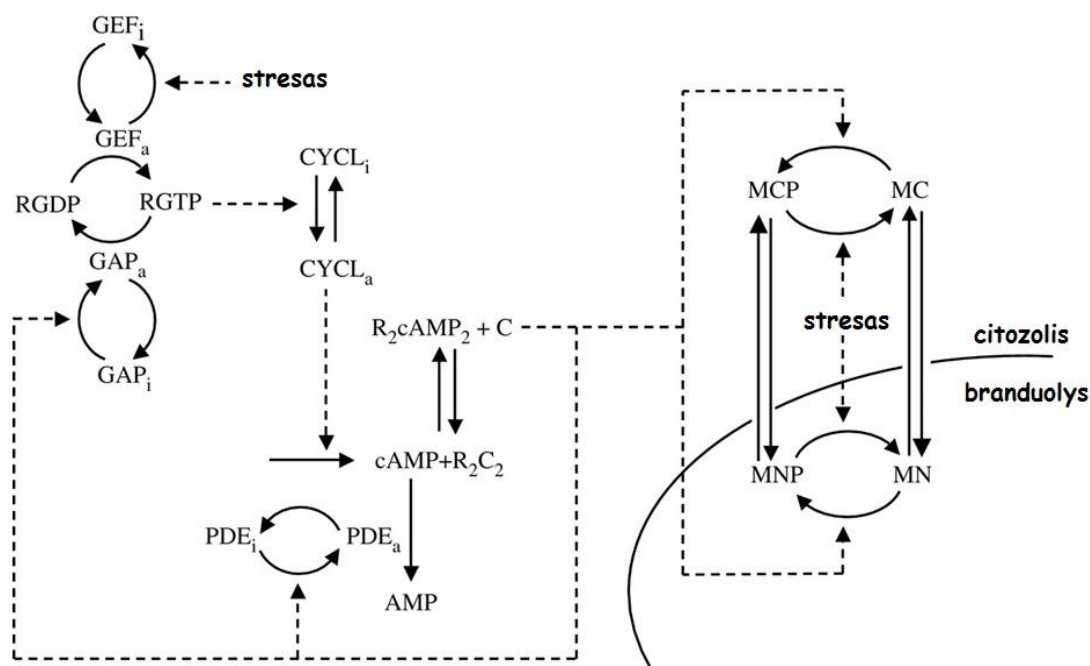
Atsarginių maisto medžiagų kiekis ląstelėje yra labai svarbus jai adaptuojantis prie kintančios aplinkos ir gebėjimui reaguoti į stresines sąlygas.

1.1.2.2 Streso atsako kontrolė

Mielėse atsaką į stresą reguliuoja dvi pagrindinės sistemos: pirmoji veikia per Hsf1 – karščio šoko ir Yap1 oksidacinio streso transkripcijos veiksnius. Antroji – tai Msn2, Msn4 sistema vykdanči vadinamąjį bendrą streso atsaką. Ją aktyvina Ras/PKA signalinis kelias ir kitos signalinės sistemos. Mielių ląstelėms stresą sukelia tokios sąlygos kaip temperatūros, pH, osmozinio slėgio pokyčiai, badas, išdžiūvimas, didelė etanolio koncentracija, radiacija ir k.t. Atsaką į stresą realizuoja baltymai, o jų veiklos reguliacija vyksta genų ekspresijos, transkripcijos, translacijos ir potranslaciniam lygmenyse.

Bendras ląstelės atsakas į stresą yra vykdomas Msn2 ir Msn4 transkripcijos veiksnių dėka. Tai C₂N₂ cinko pirštų motyvą turintys baltymai, kurie savo reguliuojamų genų promotoriuose atpažįsta specifines streso atsako sekas, vadinamąsias STRE dėžutes (Estruch, 2000). Mielėse tokias sekas turi 186 genai. Tokie genai yra potencialūs Ras/PKA signalinio kelio represijos taikiniai. Per STRE elementus yra reguliuojama streso atsako genų, dalyvaujančių anglies metabolizme, transporto baltymų, proteazių, o taip pat genų, atliekančių apsauginę funkciją įvairaus streso metu šaperonų (*HSP104*, *SSA3*, *SSA4*) katalazės (*CTT1*) ir trehalozės metabolizmo genų (*TPS1*, *TPS2*, *TPS3*, *TSL1*) ekspresija (Boy-Marcotte ir kt., 1998). Žinoma, kad Ras/PKA signalinio kelio atliekama transkripcijos veiksnių, o kartų ir STRE elementus turinčių genų reguliacija yra būtina sėkmingam ląstelės augimui ir vystymuisi (Smith ir kt., 1998).

Streso metu skirtingų, STRE elementus turinčių genų ekspresija yra reguliuojama skirtingai. Manoma, kad tokiais atvejais svarbi yra STRE elemento padėtis reguliuojamojo geno promotoriuje. Greta STRE elementų promotoriuje gali būti ir kiti veiksniai, tai yra PDS elementai. PDS elementai – tai dar vienas cis reguliatorių pavyzdys mielių ląstelėse. Šie elementai taip pat yra neigiamai reguliuojami Ras/PKA, tačiau jų reguliacija skiriasi nuo STRE sistemos (Estruch, 2000; Ruis, Schuller, 1995). Pirmiausia tokie elementai buvo nustatyti *SSA3* Hsp70 šaperonų šeimos geno promotoriuje. Vienas iš svarbių šaperoninių baltymų – tai Ssa1 šaperonas. Jis sąveikauja su Cdc25 ir padeda palaikyti jo GEF funkciją, kuri yra būtina baziniam Ras aktyvumui. Streso metu ląstelėje padaugėja denatūruotų baltymų, kurie pritraukia Hsp, taip pat ir Ssa1. Tokiu būdu yra susilpninama Ssa1 sąveika su Cdc25, o tuo pačiu ir cAMP gamyba (Geymonat ir kt., 1998).



4 pav. Msn2 branduolio/citoplazminės lokalizacijos kaita yra susijusi su cAMP/PKA keliu. cAMP/PKA sistema apjungia GEF, RAS, GAP, adenilatciklazę (CYCL), fosfodiesterazes (PDE), cAMP ir PKA. R_2C_2 – neaktyvi PKA forma, C – laisvas, aktyvintas katalizinis subvienetas. Schemos aiškumui R_2C_2 ir C parodyti tik citoplazmoje, tačiau egzistuoja ir branduolyje. Egzistuoja keturios Msn2 formos: nefosforilinta Msn2 (MC), citozolinė fosforilinta Msn2 (MCP), nefosforilinta branduolinė (MN) ir fosforilinta branduolinė (MNP) (Gonze ir kt., 2008).

Genų, turinčių savo sudėtyje tik PDS elementus, transkripcijos neįtakoja mutacijos Msn2 ir Msn4 transkripcijos veiksmuose (Estruch, 2000). Tokių elementų lokalizacija promotoriuose ir jų selektyvi reguliacija skirtingose aplinkos sąlygose suteikia ląstelėms adaptacinio plastiškumo. Msn2 ir Msn4 transkripcijos faktorių lokalizacija kinta ląstelėje priklausomai nuo aplinkos sąlygų (4 pav.). Stresas mažina GEF aktyvumą ir sąlygoja Msn2 defosforilinimą. Ląstelėse, augančiose normaliose sąlygose, šie transkripcijos veiksniai yra lokalizuoti citoplazmoje, o stresą patyrusiose mielėse jie labai greitai koncentruojami branduolyje. Msn2 ir Msn4 lokalizacija priklauso nuo PKA aktyvumo. Esant neaktyviai PKA, jie kaupiasi branduolyje, o esant aukštam PKA aktyvumui – citoplazmoje (Gorner ir kt., 1998). Yra įrodyta, kad PKA fosforilina Msn2 baltymo domeną NLS, kuris ir yra atsakingas už šio veiksnio lokalizaciją branduolyje (Gorner ir kt., 2002). Esant streso sąlygoms NLS yra defosforilinamas ir greitai nukeliavęs į branduolį keičia genų ekspresiją.

Tokios sistemos dėka ląstelės geba greitai reaguoti į aplinkoje ar ląstelės viduje susidariusias stresines sąlygas ir prisitaikyti prie jų. Atsakydamos į stresą ląstelės pertvarko savo augimo ir dalijimosi programas ir šiuose procesuose Ras/PKA vaidina svarbų vaidmenį.

1.1.2.3 Ląstelės augimo ir proliferacijos kontrolė

Mielių dalijimosi greitis ir ląstelių dydis labai priklauso nuo skirtingų aplinkos sąlygų. Ląstelėms augant terpėje su gliukoze, jos dalijasi 3–4 kartus greičiau nei augdamos etanolio terpėje. Be to, ląstelės, augančios gliukozės aplinkoje būna didesnės negu augančios terpėje su neturtingais anglies šaltiniais. Taigi molekuliniam lygmenyje nuolat vyksta reguliacija, užtikrinanti dalijimosi ciklo trukmės ir ląstelės dydžio koordinaciją. Kritinis dalijimosi ciklo taškas, kuriame nulemiamas ląstelių dalijimasis, yra G1/S fazių riba – STARTO taškas. Šiame taške svarbiausi reguliatoriai yra ciklinų Cln1, Cln2, Cln3 ir proteinkinazės Cdc28 kompleksai (Klar ir kt., 1984; Thevelein, 1994). Cln3-Cdc28 kinazės kompleksas aktyvina *CLN1* ir *CLN2*

genų transkripciją G1 fazės pabaigoje, o Cln1-Cdc28 ir Cln2-Cdc28 kinazės kompleksai, manoma, įjungia vėlesnius įvykius, leidžiančius ląstelei pereiti STARTO tašką (Polymenis, Schmidt, 1997; Andrews, Measday, 1998).

Ras/PKA signalinis kelias turi įtakos ląstelės augimui ir proliferacijai kaip grandis, nešanti informaciją apie maisto šaltinius. Šio kelio inhibicija sustabdo ląstelės ciklą G1 fazėje, tas pats vyksta ir ląstelėms augant neturtingoje mitybinėje terpėje. Ras/PKA kelio komponentai svarbūs ląstelėms pereinant ciklo G1/S fazių ribą. Kaip to įrodymas, tarp temperatūrai jautrių ląstelės ciklo *cdc* Starto mutantų buvo identifikuoti *cyr1* ir *cdc25* genų mutantai (Boutelet ir kt., 1985; Robinson ir kt., 1987).

Yra žinomi du antagonistiniai cAMP poveikiai ląstelės ciklo aparatui (Wittenberg ir Reed, 1996; Hall ir kt., 1998):

1. cAMP yra reikalingas G1 fazės ciklinų *CLN1* ir *CLN2* genų transkripcijos aktyvinimui, kuris priklauso nuo *CLN3-CDC28* komplekso. Transkripcijos aktyvinimas nevyksta pašalinus *CLN3* geną. Cln3 baltymo kiekis savo ruožtu yra reguliuojamas cAMP. Įrodyta, kad nuo anglies šaltinio priklauso Cln3-Cdc28 kinazės komplekso aktyvumas. Jis yra aukštas gliukozės turinčioje žemas nefermentuojamos anglies turinčioje terpėje augančiose ląstelėse (Hall ir kt., 1998; Neufeld ir Edgar, 1998).

2. Priešingo cAMP poveikio ląstelės ciklui atveju, staiga mieles perkėlus iš skurdžios terpės į turtingą, ląstelėse laikinai sumažėja *CLN1* ir *CLN2* ekspresija, nors šiose sąlygose vyksta trumpalaikis cAMP kiekio padidėjimas (Tokiwa ir kt., 1994). Šiuo metu taip pat pertvarkomas minimalus ląstelės dydis, reikalingas pereiti STARTO tašką. Kritinės ląstelės masės didėjimas koreliuoja su Ras/PKA kelio aktyvumo padidėjimu. Ras/PKA inhibuoja Cln1/2p-Cdc28 kinazės komplekso aktyvumą, reikalingą G1/S fazių kaitai. Todėl sudaromos palankios sąlygos augti ląstelės tūriui. Įmanoma, kad ciklinų ekspresija sumažėja dėl laikino streso, kurį jaučia ląstelė, kai jos aplinkoje pasikeičia anglies šaltinis (Tokiwa ir kt., 1994; Hall ir kt., 1998).

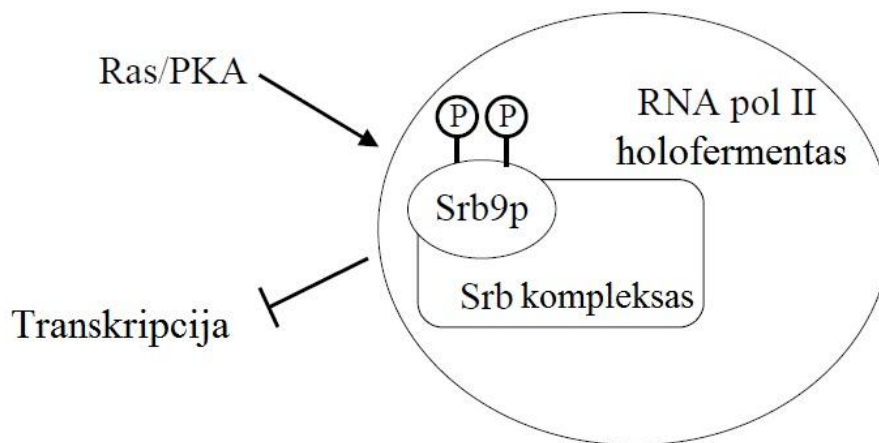
cAMP taip pat padidina ribosominių baltymų sintezės greitį (Klein ir Struhl, 1994; Griffioen ir kt., 1996; Neuman-Silvberberg ir kt., 1995,

Griffioen, Thevelein, 2002) ir taip reguliuoja baltymų sintezės greitį – be cAMP sintezė vyksta 3 kartus lėčiau. Vadinasi, cAMP yra tarsi jungiamoji grandis tarp angliavandenių metabolizmo ir baltymų sintezės (Hall ir kt., 1998). Cln3 ciklinų sintezė priklauso nuo bendro baltymų sintezės greičio, todėl sumažėjus cAMP kiekiui ląstelėje slopinama Cln3 sintezė, Cln3-Cdc28 kinazės komplekso aktyvumas, ir ląstelės ciklas sustoja G1 fazėje (3 pav.). Mielų ląstelėse, kuriose cAMP kelias neaktyvus, ląstelės ciklas sustabdomas Starto taške, o ciklinų sintezė nevyksta net ir esant visiems būtiniesiems maisto šaltiniams. Taigi vienas iš tiesioginių arba netiesioginių PKA taikinių turi būti veiksnys, reikalingas ciklinų sintezei, tačiau ryšys tarp maisto medžiagų, cAMP ir ląstelių proliferacijos kol kas mažai aiškus (Thevelein, de Winde, 1999).

1.1.2.4 Perėjimas į stacionarią fazę

Viena iš stacionariosios fazės charakteristikų yra padidėjęs atsparumas stresui. Iš vienos pusės čia veikia STRE/Msn2/4 transkripcijos reguliavimo sistema, apjungianti bendro streso atsako genus, iš kitos pusės veikia ir nuo Msn2 ir Msn4 nepriklausantys mechanizmai. Buvo įrodyta, kad *msn2 msn4* mutantai stacionariojoje fazėje nepasižymi jautrumu. Viena iš pagrindinių stacionariosios fazės reguliatorių yra proteinkinazė Rim15, turinti sekoje PKA fosforilavimo vietas ir yra jos inhibuojama. Yra žinoma, kad *rim15* mutantuose sumažėja atsparumas temperatūros pokyčiui, badui stacionariosiose sąlygose ir nevyksta stacionariosios fazės genų *HSP12*, *HSP6* ir *SSA3* transkripcija. Žinoma, kad stacionariojoje fazėje indukuojami genai gali slopinti ląstelės augimą (Reinders ir kt., 1998). *RIM15* geno delecija gali kompensuoti letalaus fenotipo, atsirandančio inaktyvius PKA, pasireiškimą.

Kitas, priklausantis nuo PKA, stacionariosios fazės reguliatorius yra didžiojo RNR polimerazės II subvieneto C-galinis domenas Rpb1CTD (Howard ir kt., 2002) (5 pav.). Buvo nustatyta, kad šio domeno sutrumpėjimas neleidžia ląstelėms pereiti į stacionarią fazę. Ras/PKA veikia RNR polimerazės II transkripcijos mechanizmą, o ne transkripcijos veiksnis.



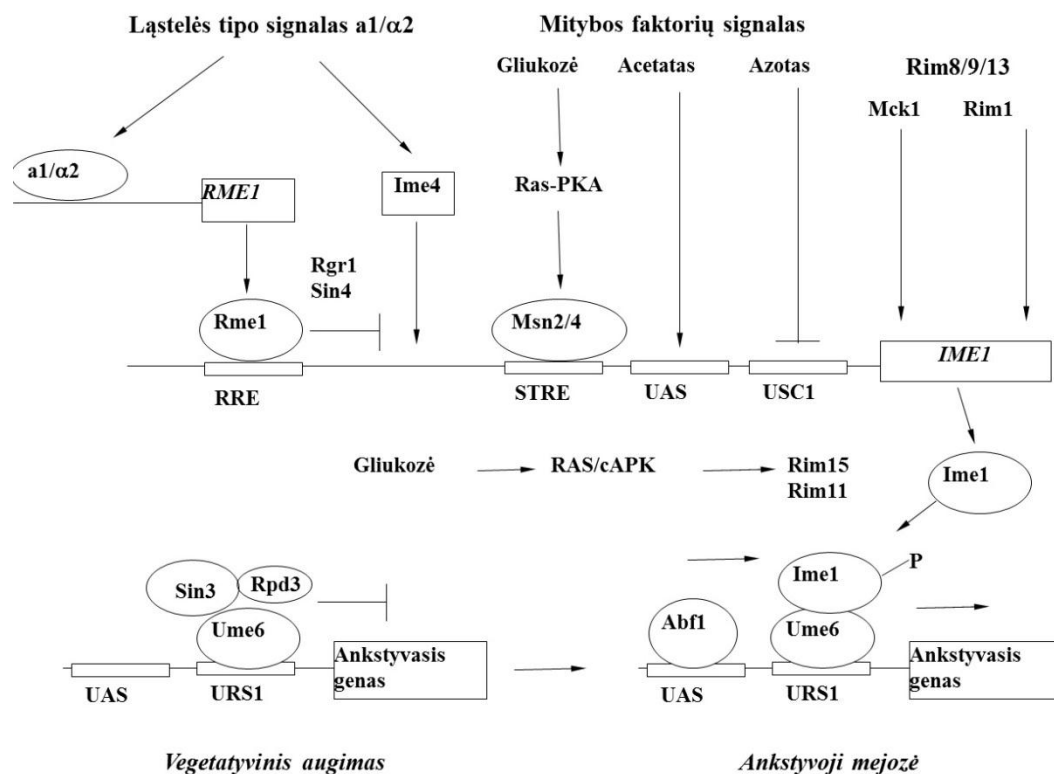
5 pav. Ras/PKA signalinio kelio atliekama genų transkripcijos reguliacija. Šiame modelyje PKA tiesiogiai fosforilina Srb9p, Srb komplekso komponentą RNRpolIII holofermente ir taip reguliuoja genų, dalyvaujančių perėjime į stacionariąją fazę, transkripciją (Howard ir kt., 2002).

Manoma, kad Ras/PKA signalinis kelias reguliuoja tam tikrų baltymų, susijusių su Rpb1CTD, funkciją, tačiau tokie taikiniai nėra nustatyti. Iš kitos pusės, manoma, kad tam tikromis augimo sąlygomis PKA gali fosforilinti CTD (Herman, 2002).

Mielių ląstelės pereinamos iš eksponentinės dalijimosi stadijos į stacionariąją fazę pertvarko savo gyvybinius procesus taip, kad prisitaikytų prie mažėjančių mitybinių išteklių ir įgytų atsparumą susikaupusiems metabolitams. Ras/PKA signalinis kelias perduoda informaciją apie aplinkos pasikeitimus ir priklausomai nuo aplinkoje esančių maisto išteklių reguliuoja stacionariosios fazės genų transkripciją, užtikrindamas balansą tarp sintezės ir degradacijos procesų, (Herman, 2002).

1.1.2.5 Sporuliacijos proceso reguliacija

Sporuliacija diploidinėse mielėse yra indukuojama ląstelėms patiriant badą. Mejozės indukcijai reikalinga genomo pertvarka, kad būtų suderinama mejozės genų ekspresija su sporų vystymąsi ir augimą kontroliuojančių genų veikla (Zurita-Martinez, Cardenas, 2005). Ras/PKA signalinis kelias sporuliaciją slopina, tačiau sporų dygimą skatina. Ras/PKA slopina pagrindinio mejozės induktoriaus *IME1* aktyvumą (6 pav.).



6 pav. *IME1* ir ankstyvųjų mejozės genų reguliacijos modelis. Haploidinėse ląstelėse Rme1 baltymas jungiasi su RRE seka *IME1* geno promotoriuje ir kartu su Rgr1 ir Sin4 represuoja *IME1*. Esant aplinkoje mažam gliukozės kiekiui Ras/PKA leidžia Msn2 ir Msn4 baltymams prisijungti prie STRE elementų ir aktyvinti geno transkripciją. Tuo tarpu, acetato signalai veikia per UAS sekas, o didelis azoto kiekis represuoja *IME1* per USC1 elementus. Ekspresuotas Ime1 baltymą fosforilina Rim11. Tai leidžia sąveikauti su Ume6, surišančiu URS1 elementus, ir pradėti ankstyvųjų mejozės genų transkripciją. Pilnam Ime1 aktyvinimui reikalinga Rim15 proteinkinazė. Daugelyje ankstyvųjų genų aptinkami papildomi reguliacijos elementai, tokie kaip Abf1, kurie leidžia dar labiau padidinti genų ekspresiją. Vegetatyvinėse ląstelėse šie aktyvinimo elementai yra represuojami Ume6, prisijungusio prie URS1 ir surišančio Sin3-Rpd3 histonų deacetilazės kompleksą. ↓, teigiama sąveika; ⊥, neigiama sąveika. Pagal Vershon ir Pierce, 2000.

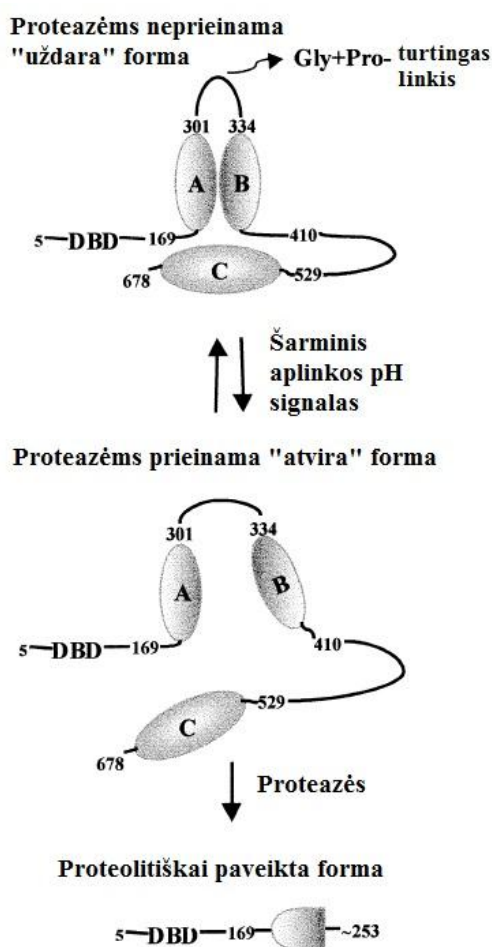
IME1 gali būti reguliuojamas tiek transkripcijos, tiek ir potranskripciniame lygmenyje. Geno sandaroje yra didelis >2kb regionas, esantis prieš transkripcijos pradžios tašką, kuriame yra 10-ties reguliacinių elementų prisijungimo vietos. Svarbiausi iš jų yra: RRE, STRE, UAS, USC1. Čia atkeliauja informacija apie ląstelės diploidiskumą, mitybinių veiksnių buvimą aplinkoje, stresines sąlygas ir pan. Potranskripciniame lygmenyje

IME1 aktyvumą reguliuoja Rim15 ir Rim11 proteinkinazės. Rim11 fosforilina Ume6, kuris yra pagrindinis DNR surišantis baltymas represorius, besijungiantis prie ankstyvųjų mejozės genų promotorių. Fosforilinti Ime1 ir Ume6 susijungia ir Ume6 tampa teigiamu reguliatoriumi. Rim15 – tai proteinkinazė, dalyvaujanti ląstelei pereinant į stacionariąją fazę, stimuliuojanti Ime1 ir Ume6 sąveiką (Herman, Rine, 1997).

1.2 pH atsako sistema

Pirmiausia atsako į aplinkos pH sistema buvo nustatyta *Aspergillus nidulans* (Arst ir kt., 1994, Denison ir kt., 1998). Šios sistemos elementai yra aptinkami ir kituose eukariotiniuose organizmuose, taipogi ir mielėse. Šiuo metu nemažai žinoma apie genus ekspresuojamus esant šarminiam aplinkos pH, de ja rūgštinėje aplinkoje ekspresuojamų genų tyrimai smarkiai atsilieka.

1.2.1 pH reguliacija *Aspergillus nidulans*



7 pav. Modelis demonstruojantis sąveikas dalyvaujant trims PacC regionams ir jų vaidmenis išvengiant proteolizės (Pagal Espeso ir kt., 2000).

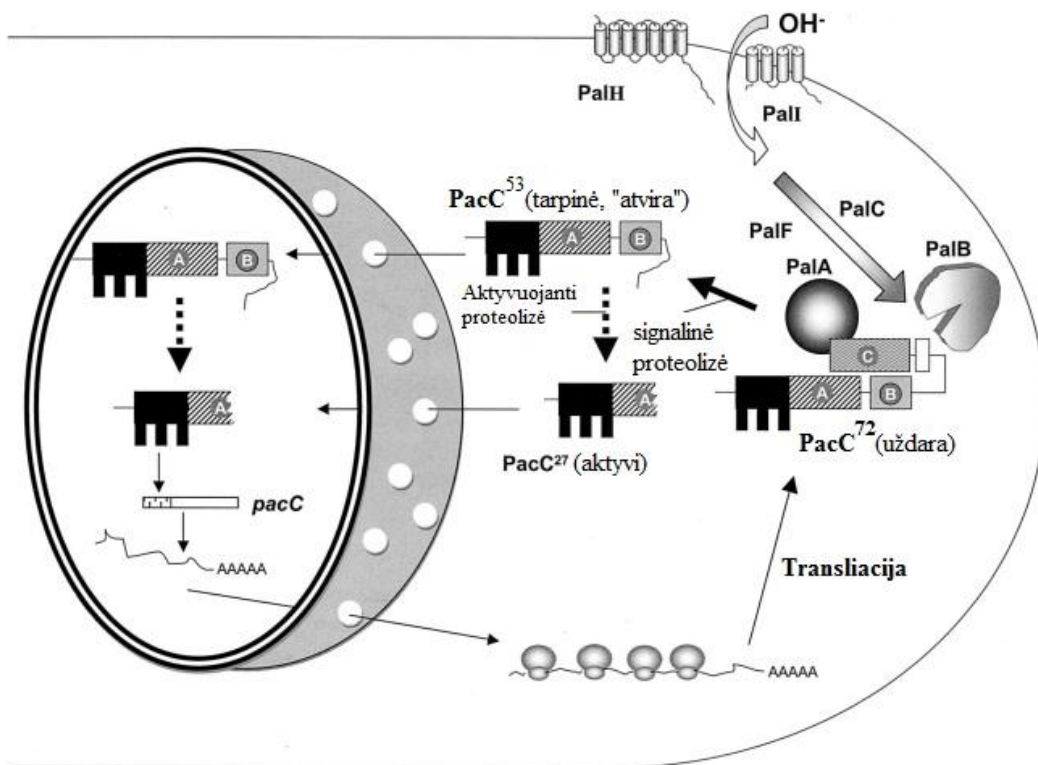
Augdami mikroorganizmai adaptuojasi prie juos supančios aplinkos pH. Tokios adaptacijos pavyzdžiu yra mikroorganizmų gebėjimas augti plačiose pH ribose. Ši jų geba yra susijusi su genų, realizuojančių savo funkcijas ląstelės paviršiuje ar išorėje, ekspresija. Tokiems genams priklauso: permeazių, sekretuojamų fermentų, streso fermentų, susijusių su eksportuojamais metabolitais, ir fermentų, atliekančių potransliacines sekretuojamų baltymų modifikacijas, genai. Tokių genų produktai veikia ląstelės išorėje ar ląstelės sienelėje (Penalva, Arst, 2004).

Pagrindinis *Aspergillus nidulans* pH mediatorius *pacC* pats yra ekspresuojamas esant šarminiam

aplinkos pH (Arst ir kt., 1994, Denison ir kt., 1998). Jis koduoja transkripcijos veiksnį, atliekantį pH reguliaciją. PacC sudarytas iš 678 aminorūgščių ir turi cinko pirštelių, besijungiančių prie DNR, domeną. PacC yra dviejų formų – 72

kDa ir 27 kDa transliacijos produktai. Rūgštiniame pH aptinkamas tik 72 kDa produktas. PacC proteolizė vyksta šarminiame pH.

Sutinkamos ir dvi mutantinės PacC formos: uždara ir atvira (7 pav.). Atvira visada prieinama proteazėms nepriklausomai nuo pH, o uždara joms neprieinama. Esant neutraliam ar šarminiam pH, PacC⁷² yra proteolitiškai veikiamas pašalinant dalį sekos ir per tarpinę PacC⁵³ formą paverčiamas PacC²⁷ (Espeso ir kt., 2000). Yra įrodyta, kad PacC²⁷ *in vivo* daug stabilesnis nei PacC⁷². GFP analizė parodė, kad PacC²⁷ ir PacC⁵³ yra išskirtinai branduolyje (Denison ir kt., 1998) (8 pav.).



8 pav. Dviejų etapų proteolizinės PacC aktyvacijos modelis. Šarminio aplinkos pH poveikyje, PacC⁷² yra verčiamas tarpine PacC⁵³ forma. PacC⁷² aptinkamas citozolyje, o PacC⁵³ – daugiau branduolyje. Dėl tolimesnės proteolizės susidaręs PacC²⁷ aptinkamas išskirtinai branduolyje, kur jungiasi prie savo reguliuojamų genų promotorių. Pats PacC yra šarminiame pH ekspresuojamas genas. (Pagal Penalva, Arst 2002).

Mutacijos, įtakojančios pH reguliaciją, sąlygoja du fenotipus, tai yra šarminį pH imituojantį, kai mutantinės ląstelės neutraliame ar rūgštiniame pH elgiasi kaip esant šarminei aplinkai, ir rūgštinį pH imituojantį, kai ląstelės

neutraliame ar šarminiame pH demonstruoja rūgštinei aplinkai būdingą elgseną (Penalva, Arst 2002).

pH reguliavimą vykdo pagrindiniai septyni genai: *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, *palI*. Jų mutacijos lemia vienokį ar kitokį pH imitavimą (Arst ir kt., 1994, Caddick ir kt., 1986, Denison ir kt., 1998, Denison ir kt., 1995). PacC yra pagrindinis pH mediatorius *Aspergillus* gentyje. PalH ir PalI turintys atitinkamai 7 ir 4 transmembraninius domenus, manoma, gali tarnauti kaip pH receptoriai (Denison ir kt., 1998, Negrete-Urtasun ir kt., 1999)). PalB savo sudėtyje turi polipeptidinę seką, būdingą nuo Ca^{2+} priklausomoms cisteino proteazėms (Denison ir kt., 1995). Nors nustatyta, kad PalB negali būti atsakingas už galutinę PacC proteolizę, jis gali tarnauti kaip signalinė proteazė, kuri pašalina su C regionu sąveikaujančius veiksnius, taip atverdama kelią tolimesniam proteoliziniam poveikiui (Espeso ir kt., 2000). PalA baltymo sekos analizė parodė, kad šis baltymas gali būti svarbus baltymas:baltymas sąveikose (Negrete-Urtasun ir kt., 1997). Jis reikalingas stabilizuojant PacC ir PalB sąveiką (Xu, Mitchell, 2001). *palB* ir *palA* genai yra konservatyvūs, jų homologai yra randami daugelyje eukariotų. Molekulinės baltymo struktūros tyrimai rodo, kad jie gali dalyvauti signalo perdavimo keliuose visuose eukariotuose nuo grybų iki žinduolių (Penalva, Arst 2002). *palC* homologų paieška parodė, kad šis genas greičiausiai yra sutinkamas tik filamentiniuose grybuose, o jo funkcija iki šiol lieka neaiški (Negrete-Urtasun ir kt., 1999).

PacC sintetinamas neaktyvios formos, o jos aktyvacijai reikia šarminio pH sukeliama signalo, kuris perduodamas *pal* signaliniu keliu. Aktyvi PacC forma yra rūgštinėmis sąlygomis ekspresuojamų genų, tokių kaip *pacA* (rūgštinė fosfatazė) ir *gabA* (GABA permeazė), transkripcijos represorius ir šarminėmis sąlygomis ekspresuojamų genų, tokių kaip *inpA* (šarminė fosfatazė), *prtA* (Izopenicilino N sintazė), *palD* (šarminė proteazė) aktyvatorius.

Mutacijos, inaktyvinančios *pacC*, lemia „rūgštinių“ genų derepresiją ir „šarminių“ genų represiją (Penalva, Arst 2002). Nustatyta, kad rūgštinių fosfatazių genai yra ekspresuojami esant rūgštinėms sąlygoms. pH

reguliuojami genai, koduojantys permeazes, taip pat yra ekspresuojami esant aplinkos rūgštiniam pH.

Nuo aplinkos pH priklausanti proteolizinė aktyvacija keičia PacC ląstelinę lokalizaciją (Mingot ir kt., 2001) (8 pav.). Nesant pH signalo, transliacijos produktas yra citoplazmoje. Pasikeitus ląstelės aplinkai į šarminę, trumpa aktyvi PacC forma aptinkama tik branduolyje. *Aspergillus nidulans* *pacC* homologai identifikuoti ir daugelyje filamentinių askomicetų, tokių kaip *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae* (MacCabe ir kt., 1996, Schmitt ir kt., 2001, Suarez, Penalva, 1996).

Saccharomyces cerevisiae, *Candida albicans* ir *Yarrowia lipolytica* mielėse taip pat nustatyti PacC reguliacinės sistemos homologai. Tokia pH reguliacinė sistema egzistuoja visose pagrindinėse askomicetų grupėse.

1.2.2 pH reguliacija mielėse *Saccharomyces cerevisiae*

Mielėse pH reguliacinė sistema apibrėžiama kaip RIM101 reguliacinė sistema (rim pavadinimas kilęs iš angl. – regulator of *IME2*).

RIM101p per *IME1* geną teigiamai reguliuoja mejozę mielių ląstelėse. *IME1* koduoja transkripcijos veiksni, kuris aktyvina daugelį mejozės genų, (Su, Mitchell 1993). Būtent Rim101p atlieka PacC funkciją mielėse. RIM101p kaip ir PacC, yra aktyvinamas baltymo brendimo metu pašalinant C-terminalinį galą. Šio proceso metu nuo C galo pašalinama 100 amino rūgščių liekana, turtinga glutamatu ir aspartatu (Caddick ir kt., 1986, Xu, Mitchell 2001).

Skirtingai nei PacC atveju, Rim101p brendimo metu vyksta tik vienas proteolizinis „kirpimas“ (Penalva, Arst 2004). Rim101p proteolizę vykdo Rim13p. Rim13p yra aktyvinamas esant šarminėms aplinkos sąlygoms (Lamb, Mitchell 2003).

Rim101p brendimui reikalingi šių genų: *Rim8p*, *Rim13p*, *Rim9p*, *Rim20p*, *Rim21p* produktai. Visi jie yra *Pal* genų, randamų *Aspergillus nidulans*, homologai.

1.2.2.1 RIM signalinio kelio komponentai

S.cerevisiae genome egzistuoja funkciniai homologai visiems *pal* genams, išskyrus *palC* (lentelė 1.).

1 lentelė. *pal* signalinio kelio komponentų homologai sutinkami mielių *S. cerevisiae* žinduolių ląstelėse.

<i>A. nidulans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Funkcija	Žinduoliai
PalA	Rim20p	Sąveikauja su Rim101/PacC	Alix/AP1 (ALG2 – sąveikaujantis baltymas)
PalB	Rim13p	Cisteino proteazė	CAPN7
PalC	-	Nežinoma	
PalF	Rim8p	Nežinoma	
PalH	Rim21p	7-is transmembraninius segmentus turintis baltymas	GPCR
PalI	Rim9p	4-is transmembraninius segmentus turintis baltymas	

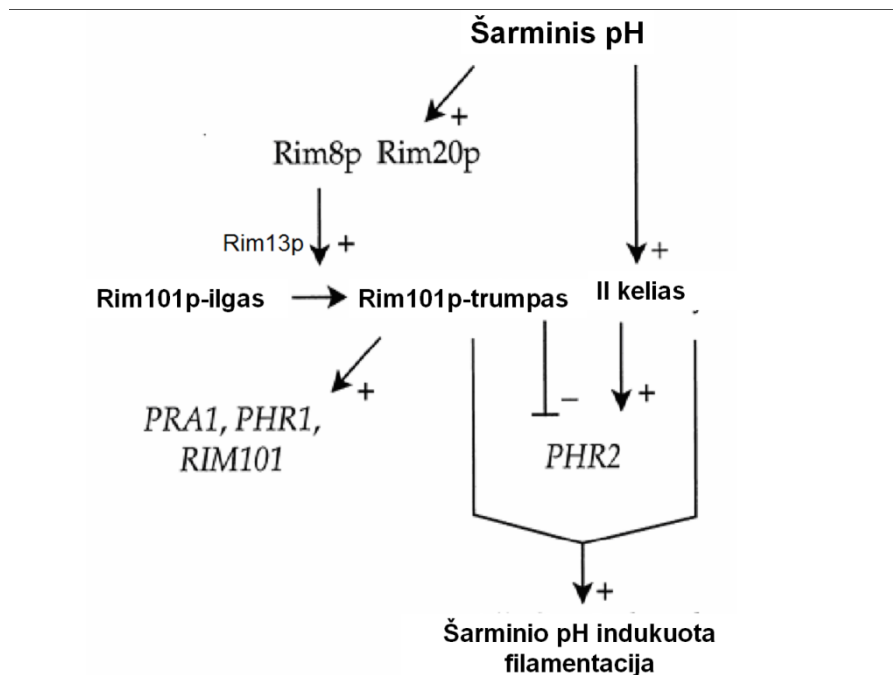
Imunoprecipitacinė analizė parodė, kad Rim20p jungiasi su Rim101p dviejose padėtyse: 547–678 aminorūgščių liekanų vietoje stipriai, 279–546 – silpnai (Xu, Mitchell, 2001). Dihbridinė analizė parodė, kad Rim20p ir Rim13p sąveikauja su Snf7p/Vps32p, genų, dalyvaujančių vakuolių biogenezėje, produktais (Ito ir kt., 2001). Panašus ryšys su endocitoze buvo įrodytas ir *Yarrowia lipolytica* mielių atveju. Tai leido iškelti hipotezę, kad Rim20p jungiasi prie Rim101p C terminalinio regiono. Snf7p veikia šioje sąveikoje kaip adapteris. Tokia sąveika padeda Rim13p proteazei pasiekti jos taikinį Rim101p (Xu, Mitchell, 2001). Šis modelis kol kas nėra patvirtintas, nes Rim101p sąveikai su Rim20p yra reikalingas papildomas baltymas (Penalva, Arst, 2002).

Kitas svarbus *palI* homologas mielėse yra RIM9. Jis turi keturis skirtingo dydžio transmembraninius domenus su itin konservatyviomis amino rūgščių sekomis. Manoma, kad tai yra mielių membraninis pH receptorius (Arst ir kt., 1994). *Rim13* koduoja proteazę turinčią Pal homologišką domeną ir šerdinę Cys128 liekaną, kuri dažniausiai teikia katalizei reikalingą tiolį (Suzuki

ir kt., 1997). PalH homologas, Rim21p ir *RIM8/palF* buvo identifikuoti Treton ir bendraautorių (2000).

1.2.2.2 Šarminio atsako kontrolės sistemos

Egzistuoja nuo Rim101 priklausoma ir nepriklausoma šarminio atsako kontrolės sistemos (9 pav.). RIM101 priklausomo atsako metu, šarminis pH stimuliuoja Rim101p aktyvumą padidindamas tiek paties geno ekspresiją, tiek ir Rim101p baltymo proteolizinę aktyvaciją. Abu šie procesai reikalauja Rim13p, Rim8p, Rim20p. Pilno ilgio Rim101 nėra aktyvus. Po proteolizės Rim101p tampa trumpa aktyvia forma, reikalinga šarminiam atsakui. Jo metu yra indukuojama: šarminio atsako genų ekspresija, šarminio atsako represorių represija ir filamentinis augimas.



9 pav. Nuo *RIM101* priklausomos ir nepriklausomos reguliacijos modelis (Davis ir kt., 2000).

Kadangi *Rim101* yra šarminių sąlygų indukuojamas genas, jo ekspresija gali priklausyti ir nuo autoreguliacijos trumpąja Rim101p forma (Lamb ir kt., 2003). Visgi buvo įrodyta, kad *RIM101* geno ekspresija nepriklauso nuo

šarminio aplinkos pH – šarminėje aplinkoje vyksta tik baltymo brendimas (Penalva ir kt., 2008). Šarminis pH stimuliuoja ir nuo *RIM101* nepriklausomą kelią. Šis kelias aktyvina *PHR2* ekspresiją, kuris nesant aktyvios *RIM101* formos, stimuliuoja filamentinį augimą.

RIM101 nepriklausomos pH reguliacijos metu pagrindinį vaidmenį vaidina *MDS3* genas, veikiantis paraleliai su *RIM101*. Tačiau ši reguliacija nėra iki galo iširta (Penalva, Arst 2004).

Rim101p sistemos genai taip pat priklauso nuo proteazės *Rim13p*, atliekančios *Rim101p* brendimą. *Rim101p* dalyvauja skirtinguose ląstelės procesuose. Jis prisideda prie atsparumo padidintai katijonų koncentracijai. *Rim101p* yra susijęs su *RIM4*, kurio geno mutacijos visiškai sustabdo sporuliacijos procesą. *Rim101p* yra reikalingas ir bendrai jonų homeostazei ląstelėje palaikyti. *Rim101* mutantai yra itin jautrūs padidintai jonų koncentracijai.

Mielių *Rim101p* veikia tiek kaip teigiamas, tiek ir kaip neigiamas genų transkripcijos reguliatorius. Tačiau skirtingai nei *PacC*, *Rim101p* veikia tik kaip represorius. Neigiama kontrolė yra atliekama tiesiogiai jungiantis prie TGCCAAG sričių genų promotoriuose, teigiama – atliekama represuojant neigiamus reguliatorius *NRG1* ar *SMP1* (Lamb ir kt., 2003). *Rim101p* neigiamai reguliuoja keletą genų, taip pat ir *RIM8*. Tai patvirtina nuomonę, kad *Rim101p* atliekama *RIM8* represija veikia kaip grįžtamo ryšio inhibitorius, silpninantis šarminio pH sukulto signalo plitimą (Ramon ir kt., 1999).

Rim101p proteolizė vyksta neutraliame ar šarminiame aplinkos pH ir sustabdoma esant rūgščiai aplinkai. Inaktyvius *RIM101* visiškai sustabdomas proteolizinis *Rim101p* apdorojimas ir gaunamas itin rūgštinės sąlygas imituojantis fenotipas. *Rim101* mutantai nesugeba augti šarminėse sąlygose, o tai reiškia, kad *RIM101* signalinis kelias yra svarbus ir ląstelėms adaptuojantis šarminėje aplinkoje (Penalva, Arst 2002). Transkripcinė analizė parodė, kad egzistuoja visa eilė genų, kurių transkripcija padidėja esant šarminiam pH priklausomai nuo *Rim101p* (Lamb ir kt., 2001).

Teresa Lamb su bendradarbiais tyrė genų, dažniau ekspresuojamų šarminiame (8,0) pH palyginus su rūgštiniu (4,0) pH, ekspresiją (2001). Jie identifikavo 71 geną, kurie buvo 2,1 karto dažniau ekspresuojami šarminiame pH, palyginus su rūgštiniu. Tai tokie genai, kurių ekspresiją, kaip buvo žinoma anksčiau, stimuliuoja didelė druskų koncentracija ar šarminis stresas. Tarp jų taip pat buvo aptikti keli genai susiję su fosfatų, geležies ar vario badu. Palyginus genų ekspresiją *rim101Δ* ir *RIM101* ląstelėse, šių genų sintetinami baltymai Northern bloto pagalba buvo suskirstyti į tris grupes:

1. griežtai priklausomi nuo RIM101.
2. dalinai priklausomi nuo RIM101.
3. nepriklausomi nuo RIM101.

1 grupei priklauso *ARN4* genas, kurio produktas svarbus geležies pasisavinimui, ir 4 nežinomų funkcijų genai. Šie genai reikalauja teigiamo RIM101p poveikio tam, kad būtų ekspresuojami šarminiame pH. Priklausomi nuo RIM101p, bet rūgštinėmis sąlygomis neekspresuojami genai, yra *ARN4* ir *VME4*.

Kitų dviejų grupių egzistavimas parodo, kad ne visi pH reguliavimo procesai yra susiję su PacC homologais. Silpnai nuo Rim101p priklauso *ENAI* ir *NRG2*. Rim101p nepriklausomų baltymų klasei priklauso *PHO84* ir *PHO11/12* (fosfatų metabolizmo genai). Visi šie genai yra sintetinami esant šarminėms sąlygoms, tačiau jų ekspresija nėra susijusi su Rim101p.

Rim101p yra teigiamas sporuliacijos, invazinio augimo, jonų tolerancijos ir pasisavinimo, adaptacijos prie šarminio pH ir tam tikrų ląstelės sienelės charakteristikų reguliatorius. Tai dalinai pasiekama per jo gebėjimą represuoti *NRG1*, kuris yra gliukozės represuotų genų, atsakingų už filamentinį ir invazinį augimą ir dalyvaujančių jonų homeostazės palaikyme, neigiamas reguliatorius (Penalva ir kt., 2008).

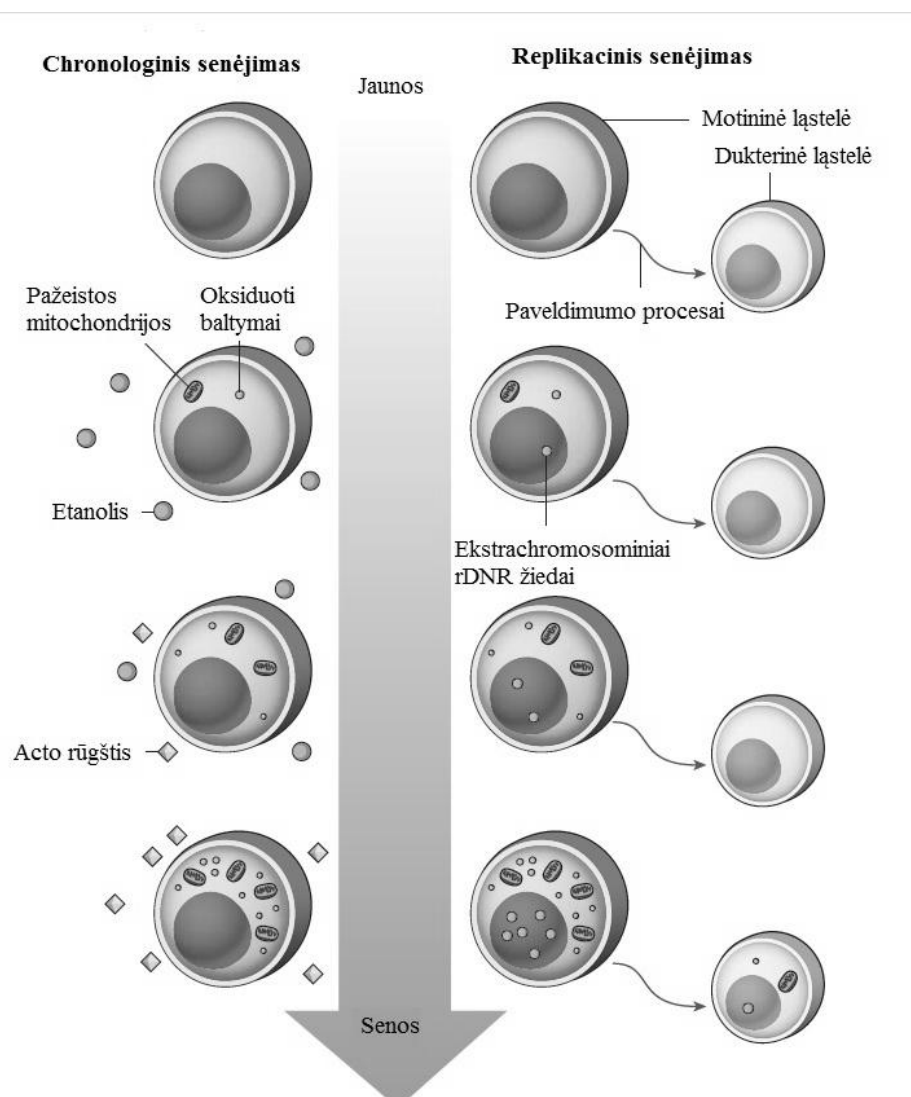
Rim101p neigiamai reguliuoja *SMP1*, kuris veikia kaip neigiamas haploidų invazinio augimo, „šiuurkščios“ kolonijų morfologijos ir sporuliacijos reguliatorius. Smp1p greičiausiai yra Rim101p reguliuojamo *CWPI* geno, koduojančio manobaltymus, kurie skatina ląstelės sienelės integralumą,

represorius (Lamb, Mitchell 2003). Teigiamas Rim101p poveikis ląstelės sienelės sintezei nėra visiškai priklausomas nuo Smp1p ir veikia paraleliai su proteinkinazės C signaliniu keliu, tačiau yra įrodyta, kad RIM101 kelias tiesiogiai dalyvauja ląstelės sienelės komplektavime (Castrejon ir kt., 2006).

1.3 Senėjimas ir apoptozė mielių ląstelėse

1.3.1 Mielių ląstelių senėjimas

Ląstelių senėjimo tyrimuose mielės yra vienas svarbiausių modeliųjų organizmų. Nors mielės turi dalį tik joms būdingų unikalių savybių, tačiau daugelis procesų yra konservatyvių tiek mielėse, tiek ir aukštesniuose eukariotuose (Kaeberlein, 2010).



10 pav. Pažaidų kaupimasis ląstelėms senėjant. Replikacinio senėjimo metu „sendinantys“ elementai praktiškai nepatenka į dukterines ląsteles. Tik pumpuruojant labai senoms ląstelėms, jie sugeba patekti į dukterines ląsteles ir šios sensta dar nesubrendusios. Chronologinio senėjimo metu pažaidos kaupiasi nesidalijančiose ląstelėse. Ekstraląstelinėje terpėje pradžioje kaupiasi etanolis, kuris vėliau paverčiamas acto rūgštimi, o ši sukelia mielių ląstelėse apoptozę. Be to, ląstelių viduje susikaupiančios pažeistos mitochondrijos ir oksiduoti baltymai greičiausiai dalyvauja senėjimo procese. (pagal M. Kaeberlein, 2010).

Mielėse aprašomi du senėjimo modeliai – replikacinis (RLS) ir chronologinis senėjimas (CLS) (10 pav.).

Replikacinis senėjimas nusakomas ląstelės maksimaliu pasidalijimų skaičiumi, kurį patiria motininė ląstelė iki pasendama, ir taip gali tarnauti modeliu mitotiškai aktyvioms žinduolių ląstelėms (Anderson ir kt., 2003).

Asimetrinio dalijimosi dėka dukterinės ląstelės išlieka jaunos, todėl žuvus motininėms ląstelėms populiacijoje išlieka replikaciniu aktyvumu pasižymintys ląstelės. Motininės ląstelės „paaukėja“ savo asmeninį replikacinį potencialą, palikdamos visą replikacinį aktyvumą dukterinėms ląstelėms (Steinkraus ir kt., 2008). Molekulinis šios hipotezės įrodymas buvo pateiktas atradus ekstrachromosominius ribosominės DNR žiedus (Sinclair, Guarente 1997). rDNR yra sudaryta iš 9–10 tandemiškai pasikartojančių sekų ir organizuota į 9,1 kb pasikartojimus, kur saugoma visa informacija, reikalinga rRNR. Ekstrachromosominiai rDNR žiedai formuojasi homologinės rekombinacijos būdu tarp rDNR pasikartojimų (Murray, Szostak, 1983). Jie geba patys replikuotis, turi *ori* sekas, dėl CEN elementų nebuvimo jie dažniausiai lieka motininėje ląstelėje ir kaupiasi joje senėjant. Įdomu tai, kad senose ląstelėse didėja simetrinio pasidalijimo atvejų, ir nors motininės ląstelės nebeįmanoma atskirti nuo dukterinės, motininė turi mažesnį replikacinį potencialą (Steinkraus ir kt., 2008). Asimetrinio dalijimosi pasekoje, motininėje ląstelėje lieka ir oksiduoti baltymai, dideli baltymų agregatai ir kitos ROS pažeistos molekulės. Toks padalijimas ir lemia pilno gyvybinio ciklo užtiktikrinimą jaunose ląstelėse (Nyström, 2005).

Tiesiogiai su gyvenimo trukme susijęs ir mielių citoskeletas. Aktino polimerizacijos baltymo Scp1 delecija mažina ROS ir pratęsia gyvenimo trukmę (Gourlay ir kt., 2004). Tačiau dukterinių ląstelių apsaugojimo mechanizmas neapsiriboja tuo, kad į jas mažiau patenka pažeistų baltymų, jose taip pat yra padidėjęs gebėjimas įveikti šiuos pažeidimus. Dukterinėse ląstelėse aptinkamas didesnis katalazinis aktyvumas (Erjavec, Nystrom, 2007).

Įrodyta, kad Sir2 NAD⁺ priklausoma histonų deacetilazė, kuri oksiduoja agreguotus baltymus, yra konservatyvus, mielių ilgaamžiškumą skatinantis

veiksnys sutinkamas taip pat ir kituose eukariotuose (Aguilaniu ir kt. 2003; Erjavec, Nystrom, 2007; Erjavec ir kt. 2007).

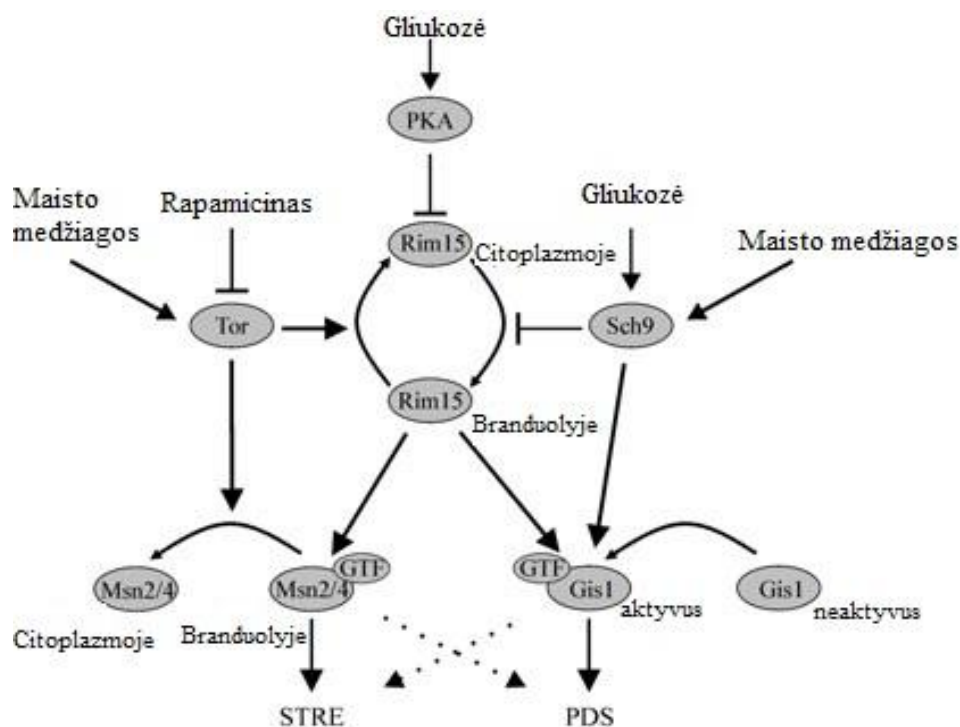
Chronologinis senėjimas vyksta nesidalijančiose stacionariosios fazės ląstelėse (Powel ir kt., 2000). Augdamos gliukozės terpėje, mielių ląstelės ją fermentuoja iki etanolio, o vėliau, sunaudojus gliukozę, etanolis yra metabolizuojamas kvėpavimo metu (Burtner ir kt., 2009). Mitochondrijų veiklos pasekoje kaupiasi ROS, ląstelės patiria oksidacines pažeidas, ir tai veda prie chronologinio senėjimo. Buvo nustatyta, kad pirminis, CLS ribojantis veiksnys gali būti acto rūgštis, kuri kaupiasi mitybinėje terpėje (Burtner ir kt., 2009). Mūsų (Lastauskienė, Čitavičius 2008, Lastauskienė, Čitavičius 2009) ir kitų mokslininkų atlikti tyrimai (Burtner ir kt., 2009) rodo, kad terpės pH buferinimas iki 5,4–6,0 ar acetato pašalinimas gali pailginti CLS. Taip pat maisto medžiagų ribojimas (MR) gali pailginti evoliuciškai nutolusių organismų gyvenimo trukmę (Masoro ir kt.; 2005, Weindruch, Walford 1988). Acto rūgšties svarba mielių gyvenimo trukmės ir žūties reguliavime nebekelia abejonių. Manoma, kad kitos organinės rūgštys, išsiskiriančios mielių augimo metu, gali turėti antrinį poveikį acto rūgšties toksiškumui rūgštindamos mitybinę terpę (Burhans, Weinberger 2009).

CLS yra reguliuojamas ir keleto genetinių veiksnių, dalyvaujančių streso atsake ir atsake į mitybinių šaltinių buvimą aplinkoje. Tyrimai parodė, kad už atsaką į maisto šaltinius atsakingos Sch9 kinazė ir adenilateiklazė Cyr1p. Jos yra neigiamos CLS reguliatorės (Fabrizio ir kt., 2001).

Sch9 proteinkinazė yra struktūriškai susijusi su PKA kataliziniais subvienetais. Pradžioje ji buvo izoliuota kaip daugiakopijinis augimo defektų, sukiamų PKA signalinio aktyvumo sumažėjimo, supresorius, ir buvo manoma, kad signaliniame kelyje veikia aukščiau PKA (Toda ir kt., 1988). Teigiama, kad Sch9 gali reaguoti į aplinkoje esančius maisto šaltinius ir nepriklausomai nuo cAMP įtakoti tokias ląstelės charakteristikas kaip atsparumas stresams (Thevelein, de Winde 1999). Žinoma, kad Sch9 yra susijusi ir su ląstelės dydžio reguliacija (Jorgensen ir kt., 2002) ir ilgaamžiškumu (Fabrizio ir kt., 2003). Sch9 kontroliuoja ląstelės augimo

funkcijas nepriklausomai nuo PKA ir žemiau esančių jos efektorių Msn2/4. Abi kinazės gali pasižymėti tiek sinergistiniu, tiek ir antagonistiniu poveikiu savo taikiniams (Roosen ir kt., 2005).

CLS trukmės ilgėjimas, priklausantis nuo mutacijų *Cyr1*, *Sch9* ar *Ras2*, apjungia daugelį streso transkripcijos veiksnių ir, manoma, reguliuoja antioksidantinių fermentų ekspresiją ir taip mažina oksidacinį stresą (Wei ir kt., 2008; Cheng ir kt., 2007a, Cheng ir kt., 2007b). Tačiau kertiniu veiksnium, lemiančiu CLS, yra TOR signalinis kelias (Chen ir kt., 2006).



11 pav. Sch9, PKA ir TOR ryšys ląstelėje. Pagrindinė PKA reguliuoja aktyvumą ir signalus, perduodamus per pirminius signalinius kelius, tokius kaip Sch9 ir TOR. Sch9 teigiamai reguliuoja PDS-priklausomų genų ekspresiją per Rim15 ir Gis1. TOR ir PKA kontroliuoja Stre-priklausomų genų ekspresiją per Msn2/4 ir Rim15. GTF veikia kaip pagrindinis transkripcijos kompleksas (Pagal Roosen ir kt., 2005).

TOR (angl. *Target of rapamycin*) – tai serino/treonino proteinkinazė konservatyvi visuose eukariotiniuose organizmuose. Ji veikia dviejuose multibaltyminiuose TORC1 ir TORC2 kompleksuose, kurie reguliuoja ląstelės augimo etapus. TORC1 yra inhibuojamas rapamicinu ir koordinuoja ląstelės augimo ir metabolizmo balansą. TORC2, reguliuoja erdvines augimo

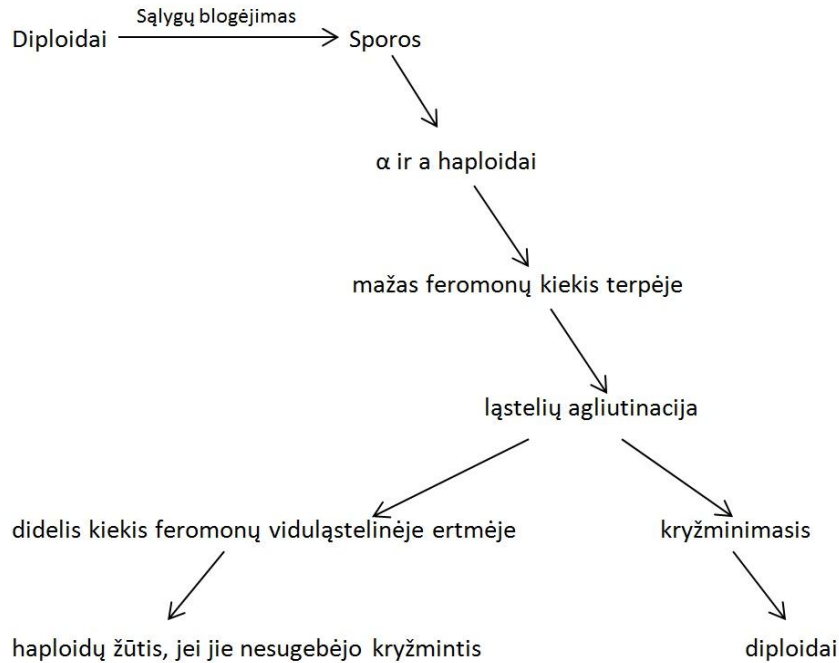
problemas, tokias kaip ląstelės poliariškumas, ir jo neveikia rapamicinas (De Virgilio, Loewith, 2006). Sumažintas TOR signalinio kelio aktyvumas skatina ilgaamžiškumą didindamas kvėpavimo aktyvumą ir mitochondrinių baltymų sintezę (Bonawitz ir kt., 2007). Sumažėjęs TOR signalinio kelio aktyvumas didina ilgaamžiškumą mielėse ir aukštesniuose eukariotuose ir yra svarbus esant maisto medžiagų ribojimui (MR). MR mažina TOR signalinį aktyvumą (Harison ir kt., 2009, Stanfel ir kt., 2009). Visos trys signalinės sistemos mielių ląstelėse yra glaudžiai susijusios (11 pav.).

CLS yra tiesiogiai įtakojamas gliukozės koncentracijos mitybinėje terpėje. Buvo įrodyta, kad auginant mieles standartinėmis sąlygomis, SC terpėje, gliukozės koncentraciją sumažinus nuo 2% iki 0,5% ar 0,05%, ar anglies šaltiniu naudojant 3% glicerolį galima ženkliai pratęsti chronologinę gyvenimo trukmę (Burtner ir kt., 2009). Sąlygose, greitinančiose chronologinį senėjimą, etanolis yra metabolizuojamas iki acetato, kuris įjungia senėjimą veikdamas viduląstelinį ir ekstraląstelinį pH (Ruckenstuhl Ch., 2010).

1.3.2 Apoptozė mielėse

Daugialąščiuose organizmuose apoptozė vaidina svarbų vaidmenį bendros organizmo homeostazės palaikyme. Apoptozė – tai griežtai reguliuojama programuota "aktyvi" ląstelės žūtis, jos pagrindinė funkcija – palaikyti normalią daugialąščio organizmo gyvybinę veiklą, pašalinant iš organizmo mutavusias, infekuotas ar tiesiog nebereikalingas ląsteles. Ilgą laiką apoptozės reiškinys vienaląščiuose organizmuose buvo ginčytinas. Galiausiai buvo įrodyta, kad vienaląščiai organizmai taip pat geba patirti programuotą ląstelių žūtį, o mielės *Saccharomyces cerevisiae* tapo šio reiškinio tyrimų eukariotiniuose mikroorganizmuose pagrindiniu objektu (Raff., 1998, Madeo ir kt., 2002). Tačiau fiziologinė apoptozės reikšmė ir jos induktoriai vienaląščiuose organizmuose ir šiandien yra neaiškūs. Kad šio proceso pagrindas yra tai, kad vienos ląstelės programuota žūtis suteikia galimybę padidinti visos populiacijos išgyvenamumą ir aktyvumą (Skulachev, 2001). Kitaip tariant, altruistinė mirtis yra fiziologiškai naudinga tik tada, kai

organizmas egzistuoja populiacijoje. Todėl augimo terpėje turėtų egzistuoti specifinių signalų gradientas rodantis kaimynų buvimą. Vieni iš tokių signalų gali būti lytiniai feromonai (12 pav.).



12 pav. Mielių gyvybinis ciklas. Mielių ląstelės į terpę išskiria lytinius feromonus. Maža feromonų koncentracija sukelia ląstelių agliutinaciją ir kryžminimąsi tarp α ir a ląstelių. Tos ląstelės, kurios agliutinuojamos, bet nesugeba susikryžminti, yra nužudomos didelės feromonų koncentracijos susikaupiančių tarp agliutinuotųjų ląstelių membranų. Toks mechanizmas išvalo mielių populiaciją nuo tokių ląstelių (Skulachev, 2002).

Lytinių feromonų indukuojamų signalų pasekoje iš populiacijos yra pašalinamos negalinčios lytiškai daugintis ląstelės, ir padidinamas lytiškai tinkamų „partnerių“ išgyvenimas (Severin, Hyman 2002; Skulachev, 2002). Vėliau buvo įrodyta, kad tankiose, chronologiškai senose mielių kultūrose taip pat vyksta apoptozė (Herker ir kt., 2004; Fabrizio ir kt., 2003). Programuota žūtis neleidžia eikvoti maisto resursų pažeistoms, neefektyvaus metabolizmo ląstelėms ir taupo juos aplinkinėms, geriau prisitaikiusioms. Tokiu būdu susidaro palankesnės aplinkybės genomo išlikimui (Frohlich, Madeo, 2000; Costa, Moradas – Ferreira, 2001). Tankiose senose kultūrose tarpusavio pajutimo signalais gali tarnauti laipsniškas terpės rūgštėjimas ir acetatų kaupimasis aplinkoje. Atitinkamas žemo pH ir acetatų derinys gali sukelti

stacionariosios fazės ląstelių žūtį su apoptozei būdingais žymenimis (Burhans ir kt., 2009).

2001 metais Leist ir Jaatela suskirstė programuotą žinduolių ląstelių žūtį (PLŽ) į 3 grupes priklausomai nuo morfologinių pakitimų ir dalyvaujančių signalinių kelių (2001). Pirmajai grupei priklauso apoptozė, kurią apibūdina tokie morfologiniai pakitimai: chromatino kondensacija, fosfatidilserino eksternalizacija, citoplazmos susitraukimas, apoptozinių kūnelių, turinčių branduolio fragmentų, formavimasis. Apoptoziniame procese visada aktyvinamos kaspazės. Antroji grupė – apoptozę primenanti PLŽ, kurią taip pat apibūdina chromatino kondensacija, tačiau ji mažiau kompaktiška nei apoptozės metu. Papildomai gali būti nustatomi ir kiti apoptozės fenotipai. Šis procesas yra nepriklausomas nuo kaspazių. Trečioji grupė – nekrozę primenanti PLŽ, apibūdinama chromatino kondensacijos nebuvimu, tačiau kiti apoptoziniai žymenys visgi gali būti randami. Dažniausiai tai nuo kaspazių nepriklausomas procesas, tačiau tam tikrais atvejais buvo stebima pagrindinai 8 ir 1 kaspazių aktyvacija. Atsitiktinės ląstelių nekrozės ar lizės galima išvengti tik pašalinus induktorių (t.y. detergentą, oksidantus ir k.t). Tai reiškia, kad nekrozės negalima išvengti blokuojant viduląstelinius procesus, morfologiniai pakitimai nekrozės metu dažniausiai susiję su membranos integralumo praradimu. Toks skirstymas gali būti lengvai ekstrapoliuotas kitiems eukariotiniams mikroorganizmams, taip pat ir mielėms (Palkova, Vachova, 2006).

Apoptozės indukcijai mielių ląstelėse buvo pasiūlyta oksidacinė teorija, kuri teigė, kad egzistuoja tiesioginis ryšys tarp reaktyviojo deguonies kaupimosi ląstelėje ir jos žūties. Buvo įrodyta, kad apoptozę laukinio tipo mielių ląstelėse indukuoja vandenilio peroksidas, o kamienų mirtingumas padidėja, jei jie nesintetina glutationo, kuris apsaugo ląsteles nuo žalojančio reaktyviojo deguonies poveikio (Madeo ir kt., 1999). Žinoma, kad apoptozės indukcijoje dalyvauja ir kiti veiksniai. Pastaruoju metu apoptozės induktorių sąrašas vis plečiasi ir yra įrodyta, kad apoptozę gali sukelti acto rūgštis (Ludovico ir kt., 2001), UV spinduliai (Del Carratore ir kt., 2002), žemas pH

(Lastauskienė, Čitavičius 2008) ir mitochondrijų veikla (Matsuyama ir kt., 1999).

Apoptozės valdymas yra sudėtingas procesas. Stuburiniuose organizmuose apoptozė yra labai griežtai kontroliuojama. Ją indukuoti gali įvairūs aplinkos veiksniai, tokie kaip toksinai, reaktyvusis deguonis ir ląstelės procesų (replikacijos, reparacijos ir t.t.) sutrikimai. Apoptozinėms ląstelėms yra būdingi tam tikri požymiai – apoptozės žymenys: membranų raukšlėjimasis, ląstelės fragmentavimas, branduolio fragmentavimas, chromatino fragmentavimas ir kondensacija ties branduolio pakraščiu, mitochondrijų membraninio potencialo sumažėjimas, citochromo c išlaisvinimas, padidėjęs kaspazių aktyvumas, fosfatidilserino išsidėstymo plazminėje membranoje asimetrijos pradimas, vietinė apoptozinės ląstelės eliminacija greta esančiomis arba makrofagais. Tuo tarpu nekrozei daugialąsčiuose yra būdinga: ląstelių didėjimas, chromatino pradimas, mitochondrijų didėjimas ir pradimas, citoplazmos pratakumas ir toksinis poveikis gretimoms ląstelėms.

Pirmiausia programuotos žūties fenotipai mielėse nustatyti ekspresuojant jose žinduolių apoptozės reguliacijos genus, vėliau pradėti identifikuoti *S. cerevisiae* ląstelių apoptozę kontroliuojantys genai (Matsuyama ir kt., 1999). Įrodyta, kad mielėse ekspresuojamas heterologinis genas – žmogaus apoptozės agonistas Bax – skatina ląstelių žūtį, o kartu ekspresuojamas apoptozės antagonistas Bcl-2 panaikina Bax sukeltus efektus (Ligr ir kt., 1998). Kiti žinomi apoptozės reiškiniai mielėse *S. cerevisiae* susiję su membranų susiliejiimo procesuose dalyvaujančio *CDC48* geno mutacija, o taip pat histonų šaperono *ASF1/CIA1* delecija (Yamaki ir kt., 2001; Madeo ir kt., 1997).

Mielėse kol kas identifikuotas tik vienas žinduolių kaspazių holomogas – metakaspazė Mca1p/Yca1p, nors yra duomenų, rodančių, kad mielėse gali egzistuoti ir kiti kaspazes primenantys aktyvumai (Vachova, Palkova 2007). Neseniai identifikuoto *S. cerevisiae* geno *YCA1* analizė parodė, kad jis panašiai kaip žinduolių kaspazės gali reguliuoti ląstelės chronologinį amžių ir žūtį (Madeo ir kt., 2002). Mca1p, gali veikti kaip inicijacijos kaspazė mielėse.

Įrodymai, kad *Mca1p* susijusi su vandenilio peroksido (ir galimai acto rūgšties poveikio ir senėjimo) indukuojama žūtimi, kurią lydi apoptozei būdingi fenotipai, leido priskirti tokią ląstelių žūtį prie apoptozės (Madeo ir kt., 2002).

Skystose, chronologiškai senų *mca1* mutantų kultūrose FITC-VAD-FMK pagalba buvo nustatyti ir kiti kaspazės primenantys aktyvumai aptariami 1 lentelėje (Herker ir kt., 2004) (2 lentelė). Tai rodo, kad mielėse gali egzistuoti kol kas nežinomos proteazės, vienaip ar kitaip reguliuojančios programuotą ląstelių žūtį.

2 lentelė. Į kaspazės panašių proteazių dalyvavimas mielių programuotoje ląstelių žūtyje.

Biologinis procesas	<i>MCA1</i> delecijos įtaka ląstelių gyvybingumui	<i>Mca1p</i> -nepriklausomas kaspazės primenantis aktyvumas	Literatūros šaltinis
H ₂ O ₂ poveikis	Taip (10%, 60%)*	Nenustatyta	Madeo ir kt., 2002
NaCl stresas	Taip (50%, 90%)*, bet tik pirmasis 10 min..	Nenustatyta	Fannjiang ir kt., 2004
Chronologinis senėjimas	Taip, priklausomai nuo kultūros amžiaus arba teigiamas arba neigiamas efektas.	Taip (apie 70%, nustatytų naudojant FITC-VAD-FMK <i>mca1</i> ląstelėse)	Hecker ir kt., 2004
Hiperosmotinis stresas	Taip (30%, 55%)*	Taip (apie 12%)	Silva ir kt., 2005
Senėjančios mielių kolonijos	Ne	Taip (5%)	Vachova, Palkova, 2005

* Išlikusių gyvų ląstelių turinčių funkcinuojančią *MCA1*, nuošimtis palyginus su *Δmca1*.

Pateikti duomenys iliustruoja, kad mielių, kaip ir žinduolių ląstelėse egzistuoja panašūs programuotos žūties valdymo mechanizmai, tačiau mielėms yra būdingi ir kai kurie apoptozės fenotipų skirtumai:

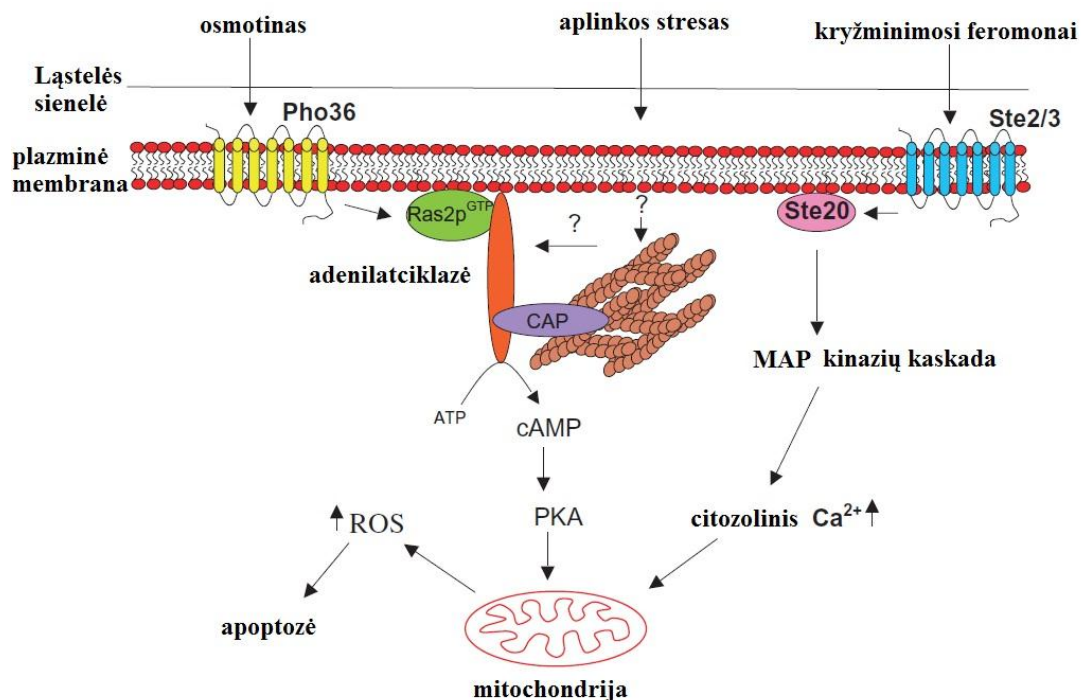
1. Mielių DNR apoptozės metu fragmentuojasi, tačiau nesudaro būdingų DNR "kopėčių". Manoma, kad taip yra greičiausiai dėl to, kad mielių

chromatino nukleosomų struktūrai būdinga trumpesnė „linkerinė“ DNR arba jos visiškai nėra (Lowery, Widom, 1989).

2. Apoptozinėms mielių ląstelėms būdingi ir kai kurie nekrozės bruožai: ląstelių didėjimas (Yamaki ir kt., 2001) ir membranų pratakumas vėlyvoje apoptozės stadijose (Ludovico ir kt., 2001).

Todėl kalbant apie ląstelės žūtį mielėse buvo pasiūlytas terminas prototipinė aktyvi ląstelės žūtis, kuriai yra būdingos ir pasyvios žūties savybės (Yamaki ir kt., 2001).

Daugiausiai problemų tyrėjams kelia apoptozės valdymas mielių ląstelėse. Tokiame procese turėtų dalyvauti signalinės sistemos, kurios reguliuotų aktyvius ląstelės degradacijos procesus kaip atsaką į letalius aplinkos signalus. Toks aktyvios reguliacijos pavyzdys yra Ras/PKA signalinio kelio įtaka citochromo c oksidazės aktyvumui ir jo išlaisvinimui žinduoliuose (Yang ir kt., 1998).



13 pav. Mielių apoptozės signaliniai keliai. Ras signalinio kelio aktyvinimas sukeltas paveikus antigrybeliniu preparatu osmotinu, kuris susiriša su Pho36 receptoriu, ir šerdinės aktino dinamikos stabilizavimo. Abu šie procesai veda prie ROS-priklausomos apoptozės. Apoptozę sukelia ir didelė kryžminimosi feromonų koncentracija (Gourlay ir kt., 2006a).

Įrodyta, kad reguliacinis proteinkinazės A subvienetas gali sąveikauti su citochromo c oksidazės Vb subvienetu, ir ši sąveika priklauso nuo cAMP. Citochromo c išlaisvinimas iš mitochondrijų periferinės membranos gali aktyvinti kaspazes ir apoptozę. Autoriai teigia, kad per PKA sąveiką su Vb, cAMP inhibuoja citochromo c oksidazės aktyvumą, kas ir nulemia padidėjusį citochromo c kiekį citoplazmoje. Įrodyta, kad konstitutyvusis Ras signalinio kelio aktyvinimas sukelia apoptozę tiek *Candida albicans* (Phillips ir kt., 2006), tiek ir mielėse (Gourlay, Ayscough, 2006a).

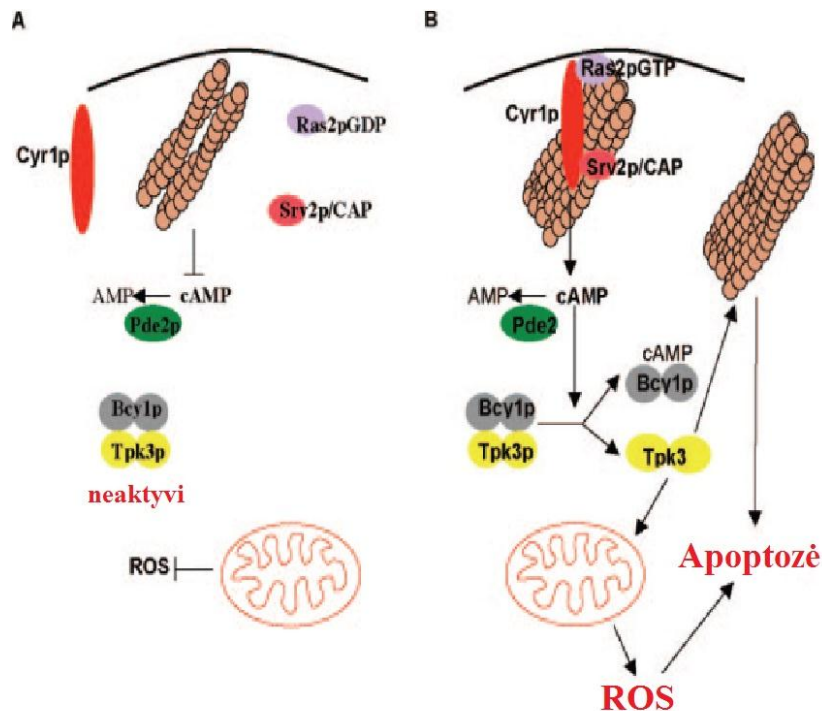
Osmotino, augalų antigrybelinio baltymo, priklausančio PR-5 augalų apsauginių baltymų šeimai, tyrimai parodė, kad jis geba sukelti apoptozę Ras/PKA keliu mielėse tiesiogiai be Ras2p baltymo aktyvinimo (Narasimhan ir kt., 2001). Osmotinas prisijungia prie į G-baltymus panašaus Pho36p ir sukelia Ras signalinio kelio aktyvinimą ir tai pasibaigia ROS produkcija ir mirtimi (13 pav.).

Kryžminimosi feromonai susiriša su tam tikrais (su G baltymais susijusiais) receptoriais (Ste2p ar Ste3p) ir lemia MAP kinazių kaskados aktyvinimą. Tai sukelia citozolinio Ca^{2+} kiekio padidėjimą, kvėpavimo suaktyvėjimą ir didesnę ROS koncentraciją.

Tai rodo, kad filogenetiškai skirtinguose eukariotiniuose vienaląsčiuose mikroorganizmuose Ras/PKA signalinis kelias gali būti vienu iš bendrų signalinių sistemų, kurios reaguodamos į aplinką gali reguliuoti ląstelių žūtį. Tačiau skirtinguose organizmuose jo aktyvacijos mechanizmai gali būti nevienodi.

Dar vienas veiksnys, reguliuojantis Ras-apoptozės kelią, yra aktino citoskeletas (14 pav.). Aktino dinamiką lėtinančios mutacijos sukelia konstitutyvųjį Ras2p aktyvinimą, ROS gamybą ir apoptozę (Gourlay, Ayscough, 2006b). Toks Ras signalinio kelio hiperaktyvinimas didina cAMP lygį ir aktyvina PKA. Ši kaskada sąlygoja ROS didėjimą ir apoptozę. PKA Tpk3p subvienetas yra atsakingas už apoptozės indukciją, kaip atsaką į aktino reguliuojamą padidintą Ras aktyvinimą. Panašu, kad Tpk3p veikia tiesiogiai

tiek F-aktino reguliacinius baltymus, tiek ir mitochondrijų fermentų sudėtį. Agreguoto aktino ir konstitutyviai aktyvinto Ras sąveika veda prie apoptozės.



14 pav. Aktino stabilizavimas konstitutyviai aktyvina Ras/PKA signalinį kelią ir apoptozę mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse. Laukinio tipo ląstelėse Ras/PKA kelio komponentai nebūna asocijuoti su F-aktinu stacionariojoje fazėje. Ras aktyvumo sumažėjimas lemia mažesnę cAMP kiekį, kuris inaktyvina PKA ir išjungia signalą (A). (B) Aktino stabilizavimas lemia, kad cAMP sintezės aparato komponentai, adenilat ciklazė (Cyr1) ir Srv2p, randami asocijuoti dideliuose aktino agregatuose stacionariojoje fazėje ir Ras2p čia yra konstitutyviai aktyvintas (Gourlay, Ascough 2006b).

Pastaruoju metu ląstelių chronologinio senėjimo ir apoptozės procesai yra siejami ir su superoksidų anijonų poveikiu (Ruckensuhl Ch. ir kt., 2010). Nustatyta, kad pagrindinių signalinių kelių, tokių kaip TOR, Sch9, Ras/PKA, aktyvinimas veda prie superoksidų kiekio ląstelėje didėjimo. Šių kelių inaktyvinimas, priešingai, mažina superoksidų kiekį ir taip pratęsiamas ląstelių chronologinis amžius ir išvengiama apoptozės (Weinberger ir kt., 2010).

Tolimesni tiek mielių apoptozės, tiek ir ją įtakojančių procesų tyrimai įgalintų išanalizuoti ir suprasti programuotą ląstelių žūtį reguliuojančius mielių ląstelėse mechanizmus, padėtų moduluoti ląstelės amžių ir tuo pačiu padėtų

sukurti efektyvius apoptozės induktorius. Tai galėtų pasitarnauti farmacijos ir žemės ūkio pramonėje, kuriant prieš grybelinius preparatus. Tokių žinių pritaikymas medicinoje leistų reguliuoti ląstelių senėjimą, valdyti vėžinių ląstelių žūtį ir gydyti su acidoze susijusias ligas. Mūsų darbo metu įrodyta, kad mutacijos Ras/PKA signalinio kelio komponentuose leidžia keisti mielių ląstelių metabolizmo intensyvumą, o tai įtakoja mitybinės terpės rūgštėjimo lygį. Šios mutacijos taip pat yra susijusios su ląstelių žūties programos pasirinkimu rūgštinėje aplinkoje. Toks, Ras/PKA signalinio kelio komponentų aktyvumo įtakojamas, mielių programuotos žūties reguliavimas gali turėti tiesioginį biotechnologinį pritaikymą tuose maisto pramonės gamybiniuose procesuose, kur reikalingas tiek kontroliuojamas terpės rūgštėjimas, tiek ir valdoma ląstelių žūtis.

1.4 Bendros homeostazės palaikymas mielių ląstelėse

Pagrindinis iššūkis gyviems organizmams yra ląstelių veiklos reguliacija nuolat kintančioje aplinkoje. Staigūs maisto medžiagų įsisavinimo pasikeitimai, stresinių veiksnių atsiradimas reikalauja greito ląstelės prisitaikymo. Mikroorganizmų nesugebėjimas greitai ir teisingai reaguoti į aplinką veda prie ląstelių žūties, tuo tarpu daugialąsčiuose organizmuose tai gali tapti vėžio atsiradimo priežastimi (Airoidi E.M. ir kt., 2009). Prisitaikymą prie kintančios aplinkos reguliuoja pagrindiniai signaliniai keliai, tokie kaip Ras/PKA, TOR, Sch9.

Mielėse išsivystė keletas apsauginių sistemų, kurios geba reaguoti į aplinkos signalus. Jais gali būti įvairūs cheminiai ir fiziniai veiksniai, tokie kaip gliukozė, osmozinis slėgis, temperatūra ir aplinkos pH. Mūsų tyrimų metu buvo įrodyta, kad pakitimai Ras/PKA signalinio kelio komponentuose gali keisti ląstelių gyvybingumą ir įtakoti bendrą ląstelės homeostazę, kaip atsaką į pasikeitusią aplinką (Lastauskienė, Čitavičius, 2008; 2009). Šiame procese pagrindinį vaidmenį vaidina koordinuota Ras/PKA signalinio kelio komponentų veikla. Išorės signalui pasiekus kelio induktorių, *RAS* genus, jis greitai perduodamas adenilciklazei ir toliau, cAMP pavidalu, keliauja iki PKA, atliekančios konkrečias fosforilinimo funkcijas. cAMP hidrolizę vykdo *PDE1* ir *PDE2* genų produktai.

Du *RAS* genai vaidina nevienodą vaidmenį mielių ląstelių gyvybinėje veikloje. Pagrindinis adenilciklazės aktyvatorius yra *RAS2* genas, o *RAS1* atlieka pagalbinę funkciją. Yra du keliai, kai *RAS2* genas gali veikti kaip homeostazės reguliatorius mielių išgyvenamumo procesuose. Pirma, jis gali funkcionuoti kaip adaptacijos genas, kompensuodamas pakitimus, atsirandančius ląstelėms senėjant. Iš kitos pusės, kaip reguliacinis elementas gali dalyvauti keliuose, kurie reguliuoja ląstelės procesus, svarbius gyvybingumo palaikymui. Nustatyta, kad tiek *RAS1*, tiek ir *RAS2* genų mRNR ir baltymų kiekis mažėja ląstelėms senėjant. *RAS1* geno funkcija ląstelėje nėra iki galo aiški, tačiau žinoma, kad eliminavus *RAS2*, *RAS1* geba perimti jo

funkciją (Sun ir kt., 1994). Abu genai yra reikalingi palaikant ląstelės homeostatinį balansą tarp cAMP sintezės ir degradavimo.

RAS2 genas taip pat yra apibrėžiamas kaip ilgaamžiškumą lemiantis elementas mielių ląstelėse. Jo genų įtaka ląstelės senėjimui yra įrodyta įvairiais eksperimentais (Jazwinski ir kt., 1998; Jazwinski, 1999 a,b; 2001; 2002; 2004, Powel ir kt., 2000; Longo, 1999; Sinclair, 1999; Sinclair ir kt., 1998). Karščio šoko metu *RAS2* slopina genų, turinčių savo promotoriuose STRE elementus, transkripciją. Dėl šio aktyvumo jis mažina ląstelių išgyvenamumą letalaus karščio šoko metu. Iš kitos pusės, *RAS2* genas turi apsauginę funkciją, kai ląstelės yra veikiamos nuolatiniu, subletalium karščiu, jis slopina streso genų indukciją ir skatina augimo genų transkripciją. Bendrai *RAS2* genas paliečia ląstelės procesus, tokius kaip metabolizmas, atsparumas stresui, genetinis nestabilumas, genomo reguliacija, kurie vienaip ar kitaip įtakoja senėjimą.

Mielėse *Saccharomyces cerevisiae* yra dvi fosfodiesterazės, dalyvaujančios cAMP degradavime. Jos skiriasi savo pirmine seka: Pde2, didelio giminingumo fosfodiesterazė, priklauso gerai ištirtai fosfodiesterazių klasei, kurios atstovų randama daugelyje rūšių (Londesborough, Souranta 1983; Souranta, Londesborough, 1984; Charbonneau ir kt., 1986); *Pde1* koduoja žemo giminingumo substratui fosfodiesterazę, kurios Km reikšmė varijuoja tarp 20 ir 250 μM (Fujimoto ir kt., 1974). *Pde1* yra žinomi 4 homologai (Londesborough, Lukari, 1980). Jie identifikuoti *Vibrio fisheri*, *Dictyostelium discoideum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* rūšyse. Jau 1980 metais J. Londesborough ir T.M. Lukari teigė, kad *Pde1* gali būti svarbus didelio cAMP kiekio degradavimui, atsirandančiam po gliukozės indukcijos (1980). Yra žinoma, kad *PDE1*, o ne *PDE2* delecija sąlygoja didesnę cAMP kaupimąsi po gliukozės indukcijos ar vykstant viduląsteliniam rūgštėjimui. Pastebėta, kad pridėjus į terpę cAMP *pde2* mutantuose drastiškai padidėja vidinio cAMP kiekis, tai leido daryti prielaidą, kad *Pde2p* yra atsakingas už egzogeninio cAMP skaldymą (Wilson ir kt., 1993). *PDE2* dalyvauja ir ląstelės sienelės vientisumo palaikymo procesuose (Jones ir kt., 2003; 2004; Heale ir kt., 1994; Tomlin ir kt., 2000). Abiejų *PDE* genų

delecijos lemia padidėjusį jautrumą karščio šokui ir badui, tačiau tam tikromis sąlygomis gali formuotis netgi laukinis fenotipas (Saas ir kt., 1986; Wilson, Tatchell 1988; Jung ir kt., 2005). *Pde1* ir *Pde2* aktyvumas gali būti reguliuojamas grįžtamuoju PKA fosforiliniu (Ma ir kt., 1999). Taigi reguliuodamos viduląstelinio cAMP kiekį ląstelėje tuo pačiu jos įtakoja PKA aktyvumą ir užtikrina aplinkos veiksnių poveikio ir ląstelės sisteminio atsako pusiausvyrą.

Nustatyta, kad mielių ląstelės geriau auga rūgštiniame pH nei neutraliame ar šarminiame. Jos neutralizuoja citoplazmos rūgštėjimą per *Pma1p*, plazminės membranos H^+ -ATPazę, kuri hidrolizuoja ATP tam, kad išpumpuotų protonus iš ląstelės (van der Rest ir kt., 1995). Protonų gradientas yra naudojamas transportuojant amino rūgštis, nukleotidus, fosfatus ir daugelį kitų molekulių simporto metu. Tai taip pat sukelia elektrocheminį gradientą, kuris tarnauja katijonų pasisavinimui. Toks plazminės membranos protonų gradientas yra reikalingas maisto medžiagų pasisavinimui iš mitybinės terpės. Šiame procese *PMA1* genas vaidina svarbiausia vaidmenį (van der Rest ir kt., 1995).

Neutraliomis ar šarminėmis sąlygomis veikia dvi jonų pompos, reikalingos išgyvenimui:

- 1) membranos Na^+ -ATPazė (*Ena1p* arba *Pmr2p*) (Garciadeblas ir kt., 1993);
- 2) vakuolių membranos H^+ -ATPazė (Stevens, Forgac 1997).

Ena1p hidrolizuoja ATP tam, kad pašalintų Na^+ jonus iš ląstelės, toks Na^+ jonų gradientas leidžia pasisavinti kitus katijonus. Vakuolinė ATPazė reikalinga vakuoliniam rūgštėjimui, kuris gali atsirasti dėl fagocitozės šarminėmis sąlygomis (Nelson, Nelson 1990; Munn, Riezman 1994). Kamienai su *ENA1* geno nulinėmis mutacijomis pasižymi padidintu jautrumu augimui šarminėse sąlygose, bet gali gerai augti rūgštinėse sąlygose (Lamb ir kt., 2001).

Padidinta *ENA1* ekspresija – tai vienas kelias, kaip *S.cerevisiae* susidoroja su šarminiu pH ir padidinta Li^+ ir Na^+ koncentracija. *ENA1* yra

kontroliuojamas keleto signalinių kelių, taip pat ir Rim101p atliekamos NRG1 represijos metu šarmėjimas pasireiškia tuo, kad sutrikdo membranos protonų gradientą (Ruiz, Arino, 2007).

Augimui šarminėse sąlygose yra reikalingas ir VMA4p, kuris koduoja vakuolių H⁺-ATPazės subvienetą, reikalingą augimui šarminiame pH. Nustatyta, kad ląstelės prisitaiko prie šarminio pH didindamos abiejų, ir vakuolinės, ir plazminės membranos jonų pompų aktyvumą. Abu šie genai yra teigiamai reguliuojami *RIM101* (Penalva ir kt., 2008).

Išorinio pH kitimai sukelia transkripcinį mielių *S.cerevisiae* atsaką. Yra trys šarminių sąlygų indukuojami genai: Na⁺-ATPazės struktūrinis genas *ENA1*, *SHC1*, *SCY1*. Genas *ENA1* ir *SHC1* gali taip pat indukuoti padidėjusi druskų koncentracija. Todėl manoma, kad juos valdo vienas signalinis kelias (Hong ir kt., 1999).

Nedaug yra žinoma apie mielių genų, veikiančių rūgštinėmis sąlygomis, ekspresiją. Buvo identifikuoti 3 genai *PDR12*, *ZMS1*, *TRK*, kurių ekspresija padidėja rūgštinėje aplinkoje. Jie atitinkamai koduoja: ATP-priklausomus karboksilo anijonų transporterius, cinko pirštelių baltymus ir kalio transporterius. Rūgštinėmis sąlygomis yra ekspresuojama ir GABA-permeazė (Causton ir kt., 2001).

Aplinkos rūgštingumas yra labai svarbus veiksnys, įtakojantis ląstelės gyvybinę veiklą. Yra žinoma, kad išorinis rūgštėjimas yra susijęs su viduląsteliniu rūgštėjimu. Pastarasis, savo ruožtu, aktyvina Ras/PKA signalinį kelią. Mikroorganizmų gebėjimas adaptuotis plačiame pH intervale reikalauja vidinės pH homeostazės sistemos. Taip pat labai svarbu, kad molekulės, kurios veikia ląstelės išorėje, būtų sintetinos tik esant tokiam pH, kuriose jos yra aktyvios. Tai tokie junginiai kaip permeazės, sekretuojami fermentai, eksportuojami metabolitai ir kt. (Penalva ir kt., 2008).

Tiek Ras/PKA, tiek ir Rim101 keliai yra svarbūs palaikant ląstelės homeostazę ir padedant jai adaptuotis prie aplinkos sąlygų. Nors tiesioginės sąveikos tarp šių dviejų kelių nėra įrodyta, tačiau žinoma, kad abi signalinės sistemos, per *IME1* geną, reguliuoja tokius procesus kaip sporuliacija ir

pseudohifinis augimas. Pakitimai šiose signalinėse sistemose veda prie ląstelių gyvybinio ciklo ilgėjimo ar trumpėjimo ir nekrozės ar apoptozės indukcijos mielių ląstelėse.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Mielių kamienai, plazmidės

Darbe buvo naudoti izogeniniai SP1 mielių kamienai (6 lentelė).

6 lentelė. Darbe naudoti izogeniniai mielių kamienai.

Kamienas	Genotipas	Santrumpa	Literatūros šaltinis
JT134	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R pde2::HIS3</i>	ΔPDE2	Ma ir kt. 1999
JT135	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R pde1::LEU2</i>	ΔPDE1	Ma ir kt. 1999
JT136	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R pde1::URA3 pde2::HIS3</i>	ΔPDE1/2	Ma ir kt. 1999
JT21569	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2 + YCpU-PDE1</i>	JT21569	Ma ir kt. 1999
JT21570	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2 + YCpPDE2(URA3)</i>	JT21570	Ma ir kt. 1999
SP1	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R</i>	SP1	Stanhill ir kt. 1999
SP1 ras1Δ	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R ras1::URA3</i>	ΔRas1	Stanhill ir kt. 1999
SP1 ras1Δras2Δ/p²¹	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R ras2::LEU2, ras1::URA3 (pHa-ras, TRP1)</i>	ΔRas1/2	Stanhill ir kt. 1999
SP1 ras2Δ	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R ras2::LEU2</i>	ΔRas2	Stanhill ir kt. 1999
TK161R2V	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R Ras2^{Val19}</i>	Ras2^{Val19}	Stanhill ir kt. 1999
Tr1	<i>SP1 ras1Δ [pJR1859]</i>	Tr1	Šis darbas
Tr2	<i>SP1 ras2Δ [pJR1244]</i>	Tr2	Šis darbas
Tr3	<i>SP1 ras2^{Val19} [pJR1052]</i>	Tr3	Šis darbas
Tr4	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R pde2::HIS3 (YCpPDE2(URA3))</i>	Tr4	Šis darbas
Tr5	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R pde1::HIS3 (YCpPDE1(LEU2))</i>	Tr5	Šis darbas

SP1, *Ras2^{Val19}*, *ΔRas1*, *ΔRas2*, *ΔRas1/2* kamienai buvo prof. D. Engelbergo, Jeruzalės universitetas, Izraelis dovana. *ΔPDE1*, *ΔPDE2*, *ΔPDE1/2* yra prof. J. Thevelein, Katalikiškas Kuleuveno universitetas, Belgija, dovana. *JT21569* ir *JT21570* kamienuose dėl PKA mutacijos fermentas turi vieną funkcionalų katalitinį subvienetą *tpk1^{w1}* ir išlaiko tik bazinį aktyvumą, būtiną ląstelių išgyvenimui. Tokia mutantinė PKA forma tampa nejautri stimuliacijai padidintu cAMP kiekiu.

Plazmidės: transformacijai naudotos 3 episominės mielių plazmidės, J. Rine dovana:

pJR1244 turinti *RAS2* geną, sukonstruota *pRS424* vektoriaus pagalba;

pJR1859 turinti *RAS1* geną, sukonstruota *YEplac* vektoriaus pagrindu;

pJR1052 skirta *Ras2^{Val19}* kamieno transformacijai, sukonstruota *pRS314* vektoriaus pagrindu.

Fosfodiesterazes koduojančių genų mutantų transformacijai naudotos dvi centromerinės mielių plazmidės, padovanotos M. Thevelein: YCpPDE1 sukonstruota naudojant YEplac33, YEplac111, YEplac 195 ir pUC18 vektorius. YCpPDE2 - YCplac33, YEplac195 ir pUC19 vektorius.

Kiekvienas transformantas reprezentuoja trijų nepriklausomų transformantų augimo vidurkį.

2.2 Reagentai, rinkiniai

Darbe naudotos cheminė medžiagos ir reagentai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Naudoti reagentai ir cheminių medžiagų rinkiniai.

Mielių ekstraktas	BIOKAR
Vandeninis peptonas	DIAGNOSTICS, Prancūzija
Agarozė	BIO-RAD, JAV
Sorbitolis, Fluorescein FregEL™ DNA fragmentacijos nustatymo rinkinys	CALBIOCHEM, JAV
YNB	DIFCO, JAV
Adeninas, DTT, GuHCl, TRIS	FLUKA, Šveicarija
Acto rūgštis, CaCl ₂ , CuSO ₄ ×5H ₂ O, glicerolis, HCl, KOH, Na ₂ HPO ₄ , NaOH	LACHEMA, Čekija
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ žymuo	PROMEGA, JAV

Ampicilinas, D-galaktozė, DNR nešėjas, formaldehidai, β-gliukuronidazė/arilsulfatazė, imersinis aliejus, kalio acetatas, KCl, metileno mėlis, metioninas, MgCl ₂ , natrio acetatas, NaCl, PEG 4000, p-fenilendiaminas, skruzdžių rūgštis, tritonas X-100	MERCK, Vokietija
Peptonas	OXOID, Anglija
Leucinas	REANAL, Vengrija
Annexin-V-Fluos tirpalas	ROCHE, Vokietija
Histidinas	Merk, Vokietija
Triptofanas	Merk, Vokietija
Agarozė (žemos lydymosi temperatūros) Type100, EDTA, etidžio bromidas, krienų peroksidazė, natrio citratas, o-dianizidinas, poli-L-lizinas, PI, ribonukleazė A, α-amilazė (žmogaus seilių liaukų)	SIGMA, JAV
Agaras	Merk, Vokietija
Etanolis	AB "VILNIAUS DEGTINĖ", Lietuva
D-gliukozė, I ₂ , K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , KI, MgSO ₄ ×7H ₂ O, Na ₂ CO ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄	PEAXИM, Rusija

2.3 Terpės, tirpalai, buferiai ir kitos priemonės

Darbe naudotos mitybinės terpės ir jų sudėtis yra pateikiamos 4 lentelėje.

Terpės sudėtis nurodyta 1l vandens.

4 lentelė. Naudotos mitybinės terpės.

YPD	gliukozė	20 g
	peptonas	20 g
	mielių ekstraktas	10 g
	agaras	20 g
YPA	kalio acetatas	10 g
	peptonas	20 g
	mielių ekstraktas	10 g
	agaras	20 g
YPG	glicerolis	30 ml
	peptonas	10 g
	mielių ekstraktas	10 g
	agaras	20 g
YPGal	galaktozė	40 g
	peptonas	20 g

	mielių ekstraktas	10 g
	agaras	20 g
YPE	etanolis	20 ml
	peptonas	20 g
	mielių ekstraktas	10 g
	agaras	20 g
	Etanolis pilamas į sterilią terpę.	
N ⁻	YNB be aminorūgščių ir amonio sulfato	1,7 g
	gliukozė	20 g
	agaras	20 g
SC	YNB – be aminorūgščių su amonio sulfatu	0,67 g
	agaras	20 g
	Būtinų aminorūgščių pridedama po autoklavavimo	

*Terpių sudėtis nurodyta 1 l distiliuoto vandens

Ten, kur buvo siekiama išvengti natūralaus terpės rūgštėjimo, buvo naudojama 2-morfolinoetanosulfoninė rūgštis (MES). Ši buferinė aplinka yra labiausiai tinkanti biologinėms sistemoms. YPD terpės pH buvo 6,2, o SC terpės pH – 5,4. Kiti darbe naudoti buferiai, tirpalai ir kitos priemonės pateikiami 5 lentelėje. Jei nenurodyta kitaip, sudėtis pateikiama komponentus tirpinant 1l vandens.

5 lentelė. Naudoti tirpalai, buferiai ir kitos priemonės:

1000 × vitaminų tirpalas	β-alaninas	0,5 g/l
	biotinas	2 mg/l
	tiaminas	0,2 g/l
Jodo tirpalas	KI	0,4%
	metalinis I ₂	0,2%
PEG/LiCl/TE	45% PEG4000	90 ml
	1 M LiCl	10 ml
	1 M TRIS-HCl (pH 7,5)	1 ml
	0,5 EDTA	0,2 ml

DNR nešėjas	PEG autoklavuojamas, kiti tirpalai filtruojami. denatūruota silkės spermos DNR	10 mg/ml
TE buferis	Tris-HCl EDTA	10 mM 0,1 mM
TE-PEG	PEG4000 TE buferyje	50%
TE-LiCl	LiCl TE buferyje	0,1M
DTT	ditiotreitolis	1M
PBS, pH 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	8 g/l 0,2 g/l 2,68 g/l 0,24 g/l
TBS	Tris NaCl	20 mM 140 mM
40× metileno mėlis	0,3% metileno mėlio 70% etanolyje; skiedžiama vandeniu.	
Propidžio jodidas	propidžio jodidas	50 μM
DAPI tirpalas	100 mg p-fenilendiaminas, ištirpintas 10 ml PBS, pH > 8 su 0,5 M Na ₂ CO ₃ , pH > 9 glicerolis DAPI Tirpalas laikomas 4 °C.	90 ml 5 mg
Fiksavimo buferis, pH 6,5	KH ₂ PO ₄ MgCl ₂	40 mM 0,5 mM
Lizės buferis, pH 7,5	sorbitolis TRIS-HCl DTT EDTA	1,2 M 100 mM 50 mM 0,1 mM
Sorbitolio buferis, pH 6,5	sorbitolis KH ₂ PO ₄ MgCl ₂	1,2 M 40 mM 0,5 mM
Surišimo buferis	HEPES/NaOH NaCl CaCl ₂	10 mM 140 mM 2,5 mM

Ruošiamas 1,2 M sorbitolio buferyje		
Rūgštinio šoko indukcijos tirpalas	Sorbitolis HCl NaOH	1M 2,1 pH nustatymui
Pralaidumo tirpalas	tritonas X-100 natrio citratas	0,1% 0,1%
Polilizino stikleliai	lašas 0,1% poli-L-lizino tirpalo išdžiovinamas ant objektinio stiklelio.	

2.4 Genetiniai metodai

Klasikiniai metodai

Klasikinė mielių genetinės analizės procedūra: genotipo nustatymas buvo atliekamas pagal Sherman ir kt. (1986).

Antspaudų metodas

Mielių kolonijos štrichais išsėjamos ant YPD terpės. Viena kolonija atitinka vieną brūkšnelį. Tokios lėkštelės auginamos 2 paras 30 °C temperatūroje. Išaugusios ląstelės perkeliama ant sterilaus aksomo medžiagos ir antpaudojamos ant naujų lėkštelių.

Molekuliniai metodai

Plazmidžių išskyrimas iš *E. coli* atliekamas naudojant NucleoSpin plazmidžių DNR išskyrimo rinkinį ir remiantis gamintojo nurodymais.

Plazmidžių skyrimas iš mielių: Viena mielių kolonija arba nedidelis biomasės kiekis užsėjamas į 5 ml minimalios terpės ir auginama per naktį 30 °C temperatūroje, purtyklėje. Biomasė surenkama centrifuguojant 5 min. 5000 aps./min. greičiu. Nuosėdos plaunamos 2X TE buferiu ir suspenduojamos 1ml I tirpalo (6 M sorbitolis, 0,25 M ditiotreitolis, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5). Inkubuojama 20 min. 30 °C temperatūroje. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis ir nuosėdos suspenduojamos 150 µl II tirpalo (0,6 M sorbitolis, 0,1 M Na citratas, pH 5,8), pridėdama 150 µl β-glukuronidazės/arylsulfatazės (8,7

vnt/ml ir 3,1 vnt/ml) ir inkubuojama 30 °C temperatūroje 90 min. Nucentrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Nuosėdos plaunamos 0,6 M sorbitoliu ir TE buferiu. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Nuosėdos suspenduojamos 200 µl TE buferio ir inkubuojamos 15 min. -70 °C temperatūroje. Pridedama 400 µl NaOH/SCS (0,2 M NaOH/0,1% SCS). Pridedama 300 µl natrio acetato 3 M (pH 4,8). Paliekama inde su ledu 20 min. Pridedamas 900 µl chloroformo, sumaišoma ir centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Viršutinė fazė perkeliama į naują mėgintuvėlį, pridedama 900 µl izopropanolio, centrifuguojama. Nuosėdos plaunamos 75% etanoliu išdžiovinamos ir tirpinamos.

Mielių kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija.

Kompetentinės kultūros paruošimas. 12-18 valandų augusi mielių kultūra 1:10 santykiu persėjama į skystą YPD terpę ir 3-4 val. auginama aeruojant 30 °C temperatūroje, kol suspensijos koncentracija pasiekia OD 1,3–1,5. 12 ml tokios suspensijos centrifuguota po 2 ml centrifuginiuose mėgintuvėliuose 15 s *Eppendorf* tipo centrifugoje 11000 aps./min. Nuosėdos plaunamos 1,5 ml šalto distiliuoto vandens. Pridedama po 1 ml filtruoto 10 x TE/LiCl ir inkubuojama purtyklėje 30 °C temperatūroje 45 min. pridedama po 150 µl filtruoto DTT ir inkubuojama dar 15 min. Ląstelės 3 kartus plaunamos 1,5 ml šaltu 1M sorbitolio tirpalu ir suspenduojamos 100 µl 1M sorbitolio tirpale (Gietz ir kt., 1995).

Mielių ląstelių transformacija buvo atliekama pagal Gietz ir kt. (1995) metodiką ir elektroporacijos būdu (<http://www.uhmc.sunysb.edu/bioscience/default.htm>) su kai kuriomis modifikacijomis.

Transformacijai sumaišoma 15 µl kompetentinės kultūros ir 5 µl DNR tirpalo (3-5 µg/ µl), 30 min. inkubuojama 30 °C temperatūroje. Pridėjus 40 µl 50% TE-PEG4000 ir vieną valandą palaikius termostate 30 °C mišiniai 20–25 min. perkeliama į 42 °C vandens vonią. Po temperatūrinio šoko, pridėjus 50 µl TE, transformantai išsėjami ant selektyvios terpės.

Elektroporacijai šaltuose steriliuose mėgintuvėliuose sumaišoma: 40 µl kompetentinės kultūros ir 0,02–0,05 µg/µl DNR 5 µl tūryje. Mišiniai perkeliama į šaltas 2 mm elektroporacijos kiuvetes. Elektroporacija atliekama 2500 V 5 ms. Po elektroporacijos ląstelės išplaunamos 1 ml šalto 1M sorbitolio tirpalu ir nedelsiant išsėjamos ant mitybinės terpės.

Transformantai auginti 5–7 paras 30 °C temperatūroje.

2.5 Ras/PKA signalinio kelio fenotipų analizė

Augimas ant YPD, YPA, YPG ir YPGal terpių

2 paras 30 °C augintos mielių kultūros nuo YPD terpės tankia suspensija, mikrobiologine kilpa, buvo užsėjamos ant YPD, YPA, YPG ir YPGal terpių. Kiekvienu atveju inkubuota 30 °C ir 37 °C temperatūroje. Augimo rezultatai vertinti vizualiai pagal augimą po 48 val. kultivavimo. Kontrolei naudota turtinga YPD terpės. Eksperimentai nepriklausomai atlikti 3 kartus.

Išgyvenimas ant YPD, YPA, YPG ir N⁻ terpių

Mielių išgyvenimas terpėse su pakeistu anglies šaltiniu ir azoto bado sąlygose vertintas pagal Toda ir kt. (1985), pratęsus inkubavimo laiką. 2 paras 30 °C temperatūroje augintos mielių kultūros nuo YPD terpės buvo antspaudų metodu perkeliama ant YPD, YPA, YPG ir N⁻ terpių, skirtų inkubacijai 30 °C ir 37 °C temperatūroje. 30°C temperatūroje kultūros laikytos 9 paras, o 37 °C temperatūroje – 6 paras. Po to kultūros antspaudų būdu perkeltos į lėkštes su YPD ir augintos 48 val. 30 °C temperatūroje. Išgyvenimo rezultatai vertinti vizualiai pagal augimą po 48 val. Kontrolei naudota turtinga YPD terpės. Eksperimentai nepriklausomai atlikti 3 kartus.

Atsparumas karščio šokui

Mielių išgyvenimas po karščio šoko 55 °C temperatūroje tirtas pagal modifikuotą Broek ir kt. (1987) metodą. 2 paras 30 °C temperatūroje augintos mielių kultūros nuo YPD terpės buvo antspaudų metodu perkeliama ant

įkaitintų (ne mažiau kaip 4 val.) 55 °C temperatūros YPD lėkštelių ir inkubuojamos 55 °C temperatūroje 10, 20 ir 30 min. Kontrolinė lėkštelė buvo laikoma kambario temperatūroje. Po inkubacijos lėkštelės antspaudo metodu ląstelės pernešamos ant naujos terpės ir toliau inkubuojamos 30 °C temperatūroje termostate. Atsparumas karščio šokui buvo vertinamas vizualiai pagal kultūrų augimą po 48 val. Eksperimentai kartoti 3 kartus.

Glikogeno kaupimas

Kokybiškai glikogeno kaupimas mielių kultūrose buvo vertinamas pagal tai, kaip intensyviai jas nudažo vandeninis jodo tirpalas. 2 paras 30 °C temperatūroje augintos mielių kultūros nuo YPD terpės buvo dar kartą persėjamos ant YPD ir auginamos 2 paras. Glikogeno kaupimasis ląstelėse vertintas vizualiai, užpylus kultūras jodo tirpalu pagal ląstelių spalvos pasikeitimą po 1 min. (Chester, 1968). Eksperimentai kartoti 3 kartus.

2.6 Ląstelių gyvybingumo analizė

Mielių kamienų kultivavimo sąlygos

Ląstelių gyvybingumo įvertinimui mielių kultūros buvo auginamos aeruojant YPD, SC, YPD-MES, SC-MES terpėse 30 °C temperatūroje. Visais atvejais pradinis pH YPD terpėse buvo 6,2, o SC terpėse – 5,4. Ląstelių mėginiai analizei buvo imami po 22-jų (eksponentinė augimo stadija), 46-ių (ankstyvoji stacionarioji stadija), 78-ių (vėlyvoji stacionarioji stadija) augimo valandų.

Ląstelių gyvybingumo įvertinimas:

Mikroskopija

Nedidelis ląstelių kiekis buvo plaunamas PBS buferiu, suspenduojamas metileno mėlio arba propidžio jodido tirpaluose ir tuoj pat analizuojamas atitinkamai šviesaus lauko arba fluorescencinės (bangos ilgis: > 560 nm) mikroskopijos pagalba, kaip nurodyta žemiau. Ląstelių gyvybingumas

išreikštas nesidažančių ląstelių procentine dalimi nuo visų analizuotų ląstelių. Mikroskopijos eksperimentai atlikti Olympus Provis AX70TRF ir Nikon eclipse 80i mikroskopais.

Tėkmės citometrija

10^7 užaugintų mielių ląstelių centrifuguojama 2000 aps./min. 5 minutes. Supernatantas pašalinamas. Ląstelių mėginiai 3 kartus plaunami PBS buferiu. Imami 300 μ l ląstelių kultūros ir pridedama 3 ml 50mM natrio citrato, sumaišoma. Centrifuguojama 2000 aps./min. 5 minutes. Supernatantas pašalinamas. Ląstelės dažomos propidžio jodidu natrio citrato tirpale (50mM natrio citrato tirpalas su 8 μ g/ml propidžio jodido). Kiekvienam pavyzdžiui buvo skaičiuojama ne mažiau 20000 ląstelių. Tėkmės citometrijai naudotas „FACSort“ tėkmės citometras.

Kolonijų formavimas

Kolonijų formavimo stebėjimui mielių kamienai auginami iki vėlyvosios stacionariosios stadijos. Ląstelių kiekis 1ml mitybinės terpės įvertinamas naudojant Bürker kamerą. 100 μ l žinomo ląstelių tankio suspensijos išsėjama ant YPD terpės. Susiformavusios kolonijos skaičiuojamos po 3 parų inkubacijos termostate 30 °C temperatūroje.

Rūgštinio šoko indukcija

Rūgštinio šoko indukcijai 1M sorbitolio tirpalas naudojant HCl ir NaOH buvo rūgštinamas iki 2,1 pH. Kontrolei naudotas 5,4 pH 1M sorbitolio tirpalas. Ląstelės auginamos skystoje YPD terpėje per naktį, po to plaunamos PBS tirpalu ir supilamos į pH 2,1 arba 5,4 tirpalus 4 ir 6 val. Po inkubacijos ląstelės vėl plaunamos PBS ir atliekami ląstelių gyvybingumo ir žūties tipo įvertinimo eksperimentai.

2.7 Ląstelių žūties tipo nustatymas

Branduolių dažymas DAPI

Nedidelis ląstelių kiekis buvo plaunamas PBS buferiu, paskleidžiamas ant polilizinu padengtų stiklelių ir sausai išdžiovinamas kambario temperatūroje. Ant imobilizuotų ląstelių buvo užlašinami 4 μ l DAPI tirpalo ir uždengus dengiamuoju stikleliu preparatai iš karto buvo analizuojami fluorescenciniu mikroskopu naudojant UV filtrą (bangos ilgis: 330-380 nm) (Madeo ir kt., 1997).

Membranų dažymas aneksinu V

Citoplazminės membranos apoptozinis pakitimas – fosfatidilserino išsidėstymas išoriniame membranos sluoksnyje – buvo nustatomas FITC žymėtu aneksinu V, naudojant Rosche firmos tirpalą Annexin-V-Fluos, ir PI tirpalą, kaip nurodyta Madeo ir kt. (1997) metodikoje ir laikantis gamintojo rekomendacijų. Analizuota fluorescenciniu mikroskopu (λ 450–500 ir $>$ 560 nm) arba tėkmės citometru.

TUNEL dažymas

DNR grandinės pažeidimas buvo nustatomas terminalinės deoksinukleotidiltransferazės katalizuojama polimerizacijos reakcija, kurios metu prie laisvų 3'-OH galų nuo matricos nepriklausančiu būdu buvo prijungiami fluorescuojančia žyme žymėti dUTP. TUNEL reakcijai naudotas Calbiochem rinkinys Fluorescein FregEL DNA fragmentacijos nustatymo rinkinys. Mielų ląstelės plaunamos PBS buferiu, suspenduojamos 4 % formaldehido/PBS tirpale ir paliekamos 10 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama 1000 aps./min. 4 °C temperatūroje. Pašalinamas formaldehidai/PBS. Ląstelės suspenduojamos 200 μ l TBS buferio ir inkubuojamos 15 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis ir pašalinamas TBS. Ląstelės permeabilizuojamos resuspenduojant jas 100 μ l 20 μ g/ml proteinazės K, 5 min., kambario

temperatūroje. Proteinazė K pašalinama centrifuguojant. Ląstelės dažomos Fluorescein-FregEL™ reakcijos mišiniu ir analizuojamos fluorescenciniu mikroskopu naudojant FITC fluorescencijos bangos ilgį praleidžiantį filtrą (Madeo ir kt., 1997).

Kaspazių nustatymas

Kaspazių nustatymui mielių ląstelėse naudojamas CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker rinkinys. Nedidelis ląstelių kiekis 3 kartus plaunamas PBS buferiu. Centrifuguojama 2000 aps./min. 5 min. Pridedamas CaspACE™ FITC-VAD-FMK *in situ* žymuo iki galutinės 10 μM koncentracijos. Inkubuojama 30 °C temperatūroje, tamsoje 20 min. Centrifuguojama 2000 aps./min. 5 min. ląstelės 3 kartus plaunamos PBS buferiu. $1,5 \times 10^6$ ląst/ml užnešama ant polilizinu padengtų stiklelių. Ląstelės fiksuojamos 10 % buferiniu formaldehidu 30 min. kambario temperatūroje. Vėliau 3 kartus plaunamos PBS. Dengiamieji stikleliai uždedami naudojant specialią dengiamąją terpę. Analizuojama fluorescenciniu mikroskopu naudojant FITC filtrą. Ekperimentai atliekami remiantis gamintojo nurodymais. Visi ląstelių žūties analizės eksperimentai buvo atlikti 3 kartus. Analizuojama 30–30000 ląstelių imtis. Mikroskopijos eksperimentai atlikti Olympus Provis AX70TRF ir Nikon eclipse 80i mikroskopais. Konfokalinė mikroskopija atlikta Biochemijos institute skenuojamuoju lazeriniu mikroskopu NIKON Eclipse TE2000-S, C1plus. Tėkmės citometrijos eksperimentams buvo naudotas Imunologijos instituto „FACSort“ tėkmės citometras.

3. DARBO REZULTATAI

Mielių, kaip ir kitų eukariotinių organizmų, ląstelėse egzistuoja signaliniai keliai įgalinantys jas greitai ir kompleksiškai adaptuotis kintančioje aplinkoje. Jų pagalba ląstelė atpažįsta aplinkoje esančias maisto medžiagas, jaučia slėgio, temperatūros, druskų koncentracijos pakitimus, geba prisitaikyti prie kintančio pH ar susirasti lytinį partnerį ir t.t. Dalis signalinių sistemų, aptinkamų mielių ląstelėse, yra konservatyvios ir sutinkamos taip pat kituose eukariotuose: grybuose, augaluose, gyvūnuose ir žmogaus ląstelėse. Augimo ir metabolinis ląstelių aktyvumas reguliuojami ne tik genetiniame lygmenyje, bet yra priklausomi ir nuo aplinkos veiksnių: mitybinės terpės sudėties ir įvairių fizikinių augimo parametrų, tokių kaip temperatūra, pH, deguonies prieinamumas, osmotinės sąlygos ir k.t.

Ras/PKA signalinis kelias kompleksiškai koordinuoja ląstelės genetinių veiksnių veiklą ir taip užtikrina sėkmingą adaptaciją kintančioje aplinkoje. Todėl skirtingos mutacijos Ras/PKA signalinio kelio komponentuose gali sąlygoti jo aktyvumo padidėjimą ar sumažėjimą ir tuo pačiu skirtingą pleotropinę fenotipinę raišką.

3. 1 Ras/PKA signalinio kelio pakitimus charakterizuojantys fenotipiniai požymiai

Genetinė ir biocheminė analizė įgalino išskirti dvi, priklausančias nuo Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo, fenotipų grupes.

Padidintam Ras/PKA signalinio kelio aktyvumui būdingi fenotipiniai požymiai:

- 1) jautrumas karščio šokui ir badui (ir apskritai stresui);
- 2) mažas ląstelėje sukaupiamų atsarginių angliavandenių – glikogeno ir trehalozės kiekis;
- 3) esant ribotam maisto medžiagų kiekiui, ląstelės ciklas nesustabdomas G1 stadijoje;

- 4) nesugebėjimas augti ant nefermentuojamų anglies šaltinių (glicerolio, etanolio, acetato) ir blogai fermentuojamų anglies šaltinių (galaktozės);
- 5) diploidinėje fazėje nevyksta sporuliacija.

Sumažintam Ras/PKA signalinio kelio aktyvumui būdingi fenotipiniai požymiai:

- 1) atsparumas stresinėms sąlygoms;
- 2) didesnis nei įprastai sukaupiamo glikogeno ir trehalozės kiekis;
- 3) nuolatinė karščio šoko ir kitų stacionariosios fazės genų ekspresija;
- 4) sporuliacija turtingoje mitybinėje terpėje.

Todėl Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo lygį galima įvertinti atliekant fenotipo patikrinimą standartiniais eksperimentais (Toda ir kt., 1995).

3.1.1 Eksperimentuose naudotų kultūrų fenotipų patikrinimas

Siekiant patikrinti Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą buvo atlikti klasikiniai jo įvertinimo eksperimentai:

1. Glikogeno kaupimas. Glikogeno kiekį ląstelėse atspindi jų dažymosi vandeniniu jodo tirpalu intensyvumas. Kuo ryškesnė spalva gaunama po 1 minutės dažymo, tuo daugiau glikogeno yra sukaupta ląstelėse.

Intensyviausiai, tamsiai ruda spalva, dažėsi, taigi ir daugiausiai glikogeno sukaupė, $\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$, *JT21570*, *PDE1*, *PDE1/2* kamienų ląstelės. Todėl šie kamienai, pagal glikogeno kaupimą gali būti priskirti sumažinto Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo fenotipui. Visiškai jodo tirpalu nesidažančių *Ras2^{Val19}*, *PDE2* ir *JT21569* kamienų ląstelės rodo, kad jose susikaupiantis mažas glikogeno kiekis jau nebegali įtakoti ląstelių spalvos pasikeitimo – tai padidinto Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo fenotipas. Tarpine, šviesiai ruda spalva, dažėsi ir laukinio tipo signalinio kelio aktyvumu pasižymėjo SP1 kamieno ir visų transformantų (*Tr1*, *Tr2*, *Tr3*, *Tr4*, *Tr5*) ląstelės.

2. Karščio šoko įtaka kamienų gyvybingumui. Mielių kamienai buvo inkubuojami 55°C temperatūroje 20 ir 30 minučių. T. Toda ir bendraautorių (1995) siūlomas inkubacijos laikas 15 ir 20 minučių, tačiau 15 min. inkubacija

kamienų augimui įtakos neturėjo. Todėl pasirinkome ilgesnį inkubacijos laiką. $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$ ir $JT21570$ kamienai pasižymėjo dideliu atsparumu karščio šokui. Net ir ilgiausias inkubacijos laikas 55°C temperatūroje nesustabdė jų tolesnio augimo. Po 20 min. karščio šoko SP1, $\Delta Ras1$, $PDE1$, $PDE1/2$ ir visi transformantiniai ($Tr1$, $Tr2$, $Tr3$, $Tr4$, $Tr5$) kamienai pasižymėjo silpnesniu augimu. Po 30 min. 55 °C temperatūroje jų augimas buvo visiškai sustabdomas. Ras/PKA signalinio kelio konstitutyvus aktyvinimas, $PDE2$ geno delecija ir papildomos $PDE1$ kopijos įvedimas į PKA mutaciją turintį kamieną sąlygojo jautrumą karščio šokui. Jau po 20 min. inkubacijos 55 °C temperatūroje nebebuvo identifikuota gyvų ląstelių. Tai rodo signalinio kelio aktyvumo padidėjimą, palyginus su SP1.

3. Anglies šaltinių įtaka mielių ląstelių augimui ir gyvybingumui.

Buvo lyginamas mielių kamienų augimas YPD terpėje, su augimu terpėse, kur anglies šaltiniu tarnavo galaktozė (YPGal), kalio acetatas (YPA), glicerolis (YPG) ir etanolis (YPE) (7 lentelė). Mielių kamienų augimo terpėje su pakeistu anglies šaltiniu įvertinimas buvo atliekamas 30 °C temperatūroje, o išgyvenamumo tyrimas 37 °C temperatūroje. Visų analizuotų kamienų augimas susilpnėjo pakeitus gliukozę kitu anglies šaltiniu. RAS genų delecijas ir tuo pačiu mažesnę Ras/PKA kelio aktyvumą turintys kamienai buvo atspariausi sąlygų pasikeitimui: $\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$ kamienai gebėjo augti terpėse su pakeistu anglies šaltiniu ir išgyveno jose esant 37°C temperatūrai. Dideliu atsparumu pasižymėjo ir $PDE1$ ir $PDE1/2$ kamienai. Laukinio tipo SP1 kamienas augo visose tirtose terpėse 30 °C temperatūroje. Tokie rezultatai visiškai sutapo su anksčiau aprašytais literatūroje. $Tr1$, $Tr2$, $Tr4$, $Tr5$ kamienų augimas ir išgyvenamumas nesiskyrė nuo SP1, o $Tr3$ transformantas silpniau augo YPE ir YPGal terpėse. Silpniausiu augimu YPE ir YPGal terpėse pasižymėjo $Ras2^{Val19}$, $\Delta PDE2$ ir $JT21569$ kamienai, o YPA ir YPG terpėse šie kamienai neaugo. Išgyvenamumo tyrimas parodė, kad 37 °C temperatūroje šie kamienai neišgyvena YPA, YPG, YPGal ir N⁻ terpėse. $JT21569$ kamienas YPA ir YPG terpėse taip pat neaugo, kaip ir $Ras2^{Val19}$, jis nesugebėjo išgyventi YPA, YPG, YPGal ir N⁻ terpėse pakelus augimo temperatūrą iki 37 °C. Tuo tarpu

JT21570 kamienas 30 °C temperatūroje augo visose tirtose terpėse, taip pat jis pasižymėjo gebėjimu jose išgyventi esant 37 °C temperatūrai.

7 lentelė. Mielių ląstelių augimas (30 °C) ir išgyvenamumas (37 °C) terpėse su skirtingais anglies šaltiniais.

Mielių kamienas	Augimas terpėse					Išgyvenamumas terpėse				
	YPD	YPA	YPE	YPG	YPGal	YPA	YPE	YPG	YPGal	N ⁻
<i>SP1</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Ras2^{val19}</i>	+++	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>ΔRas1</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>ΔRas2</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>ΔRas1/2</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Tr1</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Tr2</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Tr3</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>ΔPDE2</i>	+++	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>ΔPDE1</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>ΔPDE1/2</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Tr4</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>Tr5</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
<i>JT21569</i>	+++	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>JT21570</i>	+++	+	++	+	++	+	+	+	+	+

+++ įvertintas mielių augimas YPD terpėje. Visi kamienai šioje terpėje augo vienodai gerai, nė vienoje kitoje terpėje nebuvo pasiektas toks intensyvus jų augimas.

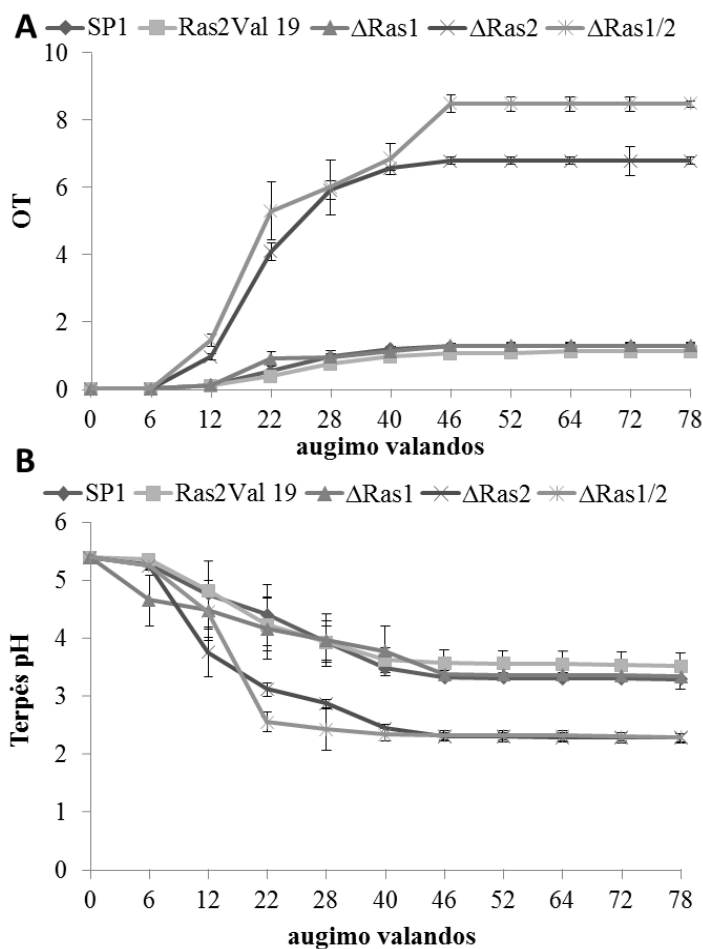
++ auga labai gerai, + auga/išgyvena, - neauga/neišgyvena.

Fenotipų patikrinimo eksperimentai leido nustatyti Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo lygį mielių ląstelėse.

3.1.2 Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaka kamienų augimui ir laipsniškam mitybinės terpės rūgštėjimui

Mielių kamienai buvo auginami dviejose skirtingose terpėse: YPD ir SC. Kas 6 valandas buvo įvertinamas kamienų augimas pagal OT ir terpės pH. Siekiant įvertinti pH, o ne mitybinės terpės įtaką augimui, ir galimą buferinės sistemos MES inhibitorinį poveikį, mielių kamienai buvo auginami buferintose terpėse YPD-MES ir SC-MES. YPD terpėms buvo parinktas pH 6,2, o SC – pH 5,4.

Auginant mielių kultūras YPD terpėje, net ir po 78 valandų augimo, buvo stebimas tik neryškus jos rūgštėjimas iki $4,47 \pm 0,134 \Delta Ras2$ kamieno atveju. Šioje terpėje gerai augo visi kamienai – augintų kultūrų OT buvo didesnis nei $7,38 \pm 0,750$. Manoma, kad šioje gliukozės terpėje buferinančio komponento vaidmenį gali atlikti peptonas. MES komponentas turtingoje YPD terpėje nesukėlė augimo pakitimų – OT išliko toks pats aukštas visų kamienų atveju. Todėl MES buvo panaudotas ir SC terpės buferinimui. Literatūroje šis buferis aprašomas kaip labiausiai tinkantis biologinėms sistemoms.



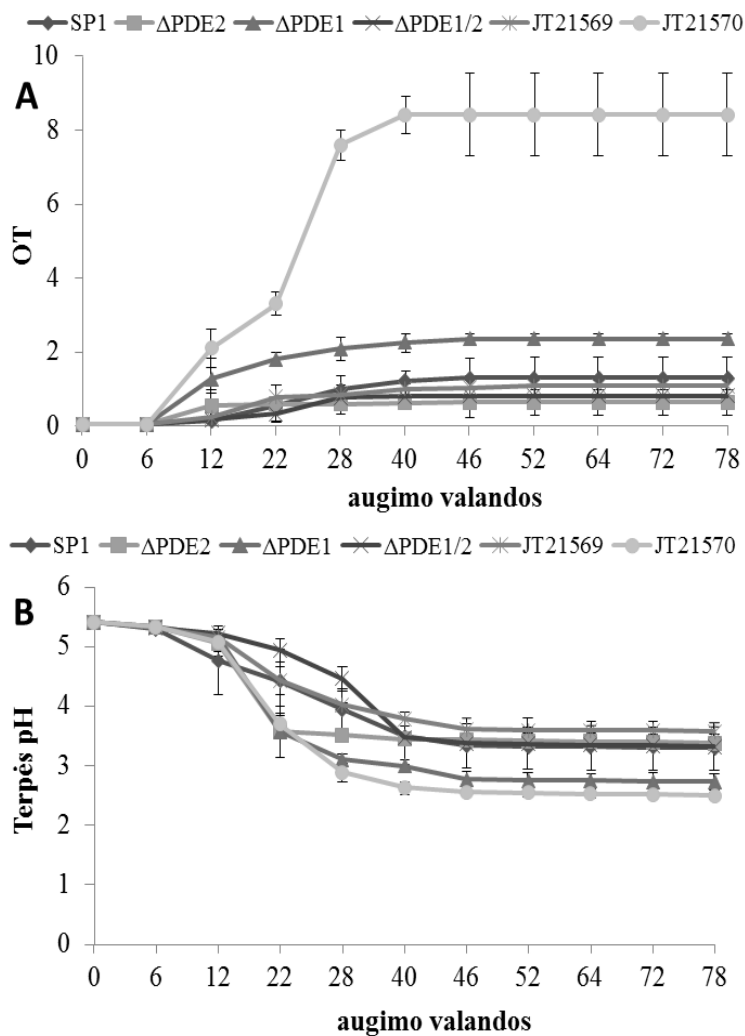
15 pav. Ląstelių kultūrų, turinčių *RAS* genų mutacijas, augimas (A) ir SC terpės pH kitimas (B).

RAS2 geno deleciją, $\Delta Ras2$ ir $\Delta Ras1/2$ (B). Žmogaus Ha-ras geno įterpimas ($\Delta Ras1/2$) ženkliai didina mielių ląstelių augimo greitį ir $\Delta Ras1/2$ kamieno augimas (A) ir pH kitimas (B) nesiskyrė nuo $\Delta Ras2$ kamieno. Tai statistiškai patikimas skirtumas, palyginus su SP1 laukiniu kamieniu. Tuo tarpu $\Delta Ras1$ ir

Ląstelėms augant SC terpėje, vyko ženklaus pH pokyčiai. Šioje terpėje išryškėjo kamienų augimo ir terpės rūgštėjimo skirtumai – geriau augantys kamienai pasižymėjo ir didesniu terpės rūgštinimu.

RAS genų mutacijas turinčių kamienų SC terpės pH kitimo rezultatai pateikiami 15 paveiksle. Labiausiai terpę rūgštino kamienai turintys,

Ras2^{Val19} kamienų augimo metu buvo pasiekiamas toks pat, kaip ir SP1 terpės pH. Labiausiai terpę rūgštinantys kamienai – $\Delta Ras2$ ir $\Delta Ras1/2$ pasiekė ir didžiausią OT. Tuo tarpu $\Delta Ras1$ ir *Ras2^{Val19}* kamienų augimas nesiskyrė nuo laukinio pagal Ras/PKA signalinį kelią nuo laukinio kamieno.



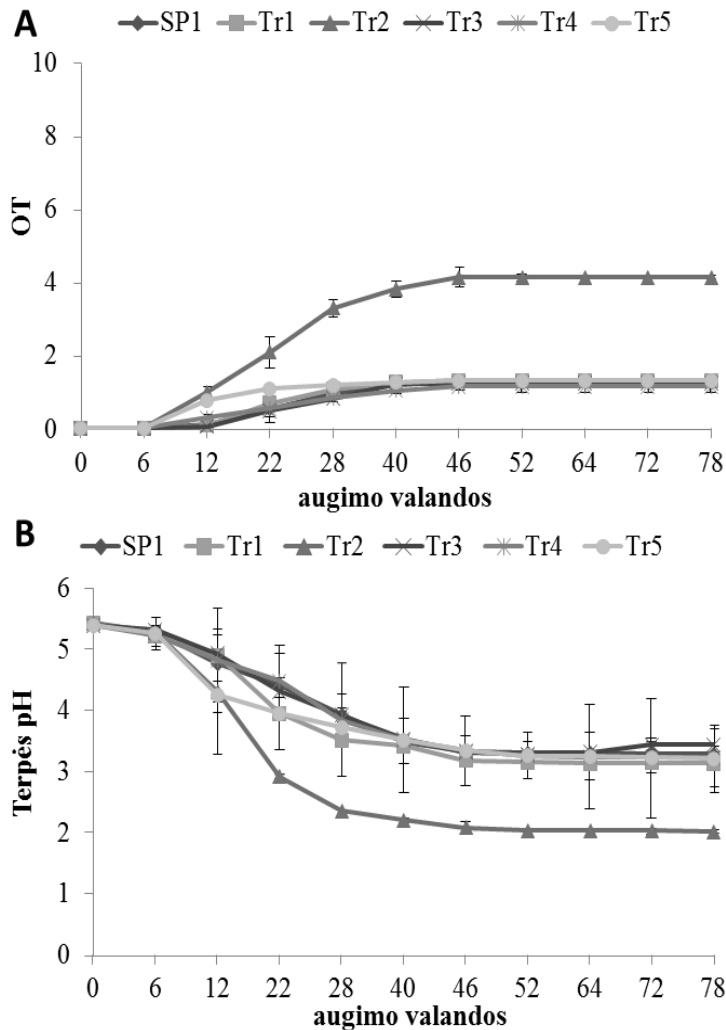
16 pav. *PDE* ir *PKA* genų mutacijas turinčių ląstelių kultūrų augimas (A) ir SC terpės pH kitimas (B).

SP1 kamieno augimas ir pH mažėjimas taip pat nesiskyrė. Skirtingų *PDE* genų įterpimas į *PKA* mutaciją turintį kamieną taip pat sąlygojo skirtingą poveikį. Intensyviausias augimas ir didžiausias pH pokytis buvo stebimas *JT21570* kamieno atveju ($p < 0,05$, palyginus su SP1 kamieniu), kur į *PKA* mutaciją turintį kamieną buvo įvesta papildoma *PDE2* geno kopija. Papildoma *PDE1*

Dviejų, fosfodiesterazes koduojančių genų delecijos sąlygojo skirtingus kamienų augimo ir terpės rūgštinimo efektus (16 pav.). $\Delta PDE1$ kamienas pasižymėjo intensyvesniu augimu (A) ir efektyvesniu terpės pH mažėjimu (B), palyginus su $\Delta PDE2$ ir laukiniu SP1 kamienais ($p < 0,05$). *PDE2* geno delecija nesukėlė nei augimo, nei pH kritimo skirtumo, palyginus su SP1 kamieniu. $\Delta PDE1/2$ ir

geno kopija neįtakojo nei JT21569 kamieno augimo, nei pH kitimo (nesiskyrė nuo SP1).

Transformantų augimas ir terpės rūgštinimas statistiškai nesiskyrė nuo laukinio SP1 kamieno (17 pav.). Tik $\Delta Ras2$ kamieno transformacija vidutinį



17 pav. Transformantų kamienų augimas (A) ir SC terpės pH kitimas (B).

kopijų skaičių turinčia plazmide nepilnai kompensavo delecijos poveikį ir Tr2 kamienas pasižymėjo statistiškai patikimai intensyvesniu augimu (A) ir ženklėniu terpės rūgštinimu (B), palyginus su SP1 kamieniu ($p < 0,05$).

Esant pastoviam terpės pH, mielių ląstelių OT buvo ženkliai didesnis. Šioje terpėje blogiausiai augo $\Delta PDE1/2$ kamienas (OT $5,22 \pm 0,06$).

Tačiau pasiekiamas OT vis tiek yra kelis

kartus didesnis nei augant SC terpėje. Panašūs rezultatai gauti ir analizuojant kitų kamienų augimą, SC-MES terpėje visi kamienai augo patikimai geriau, palyginus su jų augimu nebufferintoje SC terpėje. Jų pasiekiamas OT šioje terpėje buvo kelis kartus didesnis nei SC. $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$ ir JT21570 kamienų OT taip pat keliais vienetais buvo didesnis SC-MES terpėje, palyginus su SC ($p < 0,05$).

Mutacijos Ras/PKA signaliniame kelyje keičia tiek ląstelių metabolizmo ypatumus, tiek ir ląstelių augimo greitį ir sukaupiamos biomasės kiekį laipsniško rūgštėjimo sąlygomis. Tai, kad pastovaus pH palaikymas kelis kartus didino tiriamųjų kamienų augimo greitį ir galutinį pasiekiamą OT rodo, kad natūralus laipsniškas terpės pH mažėjimas ženkliai įtakoja mielių kamienų augimą.

3.2 Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas

Mielių kamienų kultivavimui buvo naudotos dvi terpės. YPD terpė yra tinkamiausia mielių ląstelių kultivavimui. Tiksliai jos cheminė sudėtis nėra žinoma, tačiau ši mitybinė aplinka yra palankiausia didelio biomasės kiekio gavimui. Tuo tarpu SC terpė apibūdinama, kaip žinomos cheminės sudėties aplinka. Tai leidžia selektyviai tirti skirtingų mielių kamienų augimą ir metabolizmo ypatumus griežtai apibrėžtomis sąlygomis.

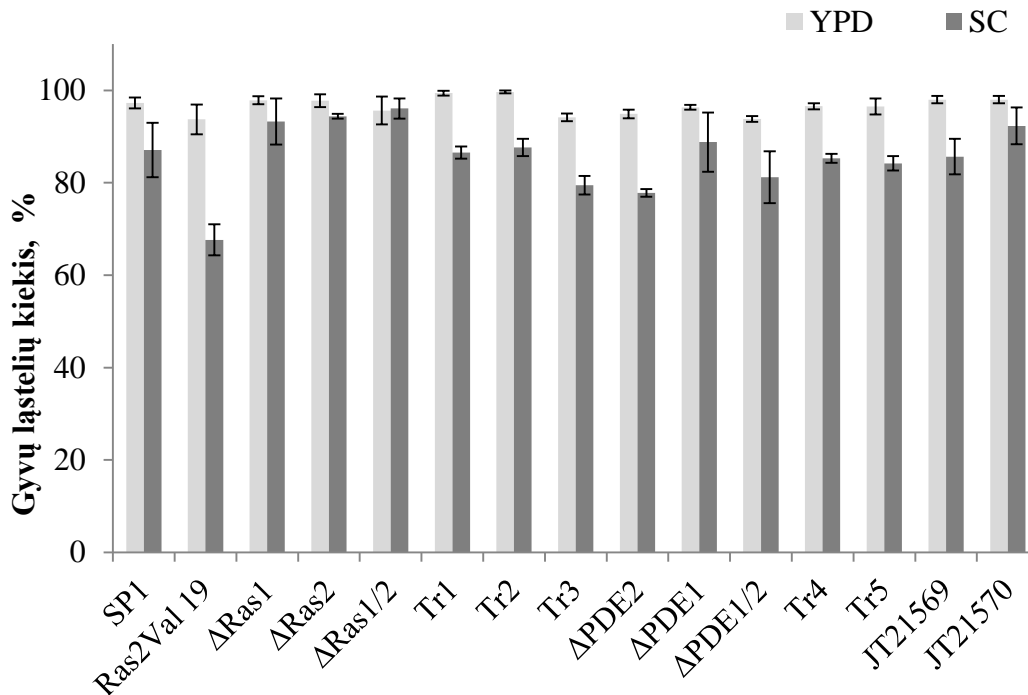
Ląstelių mėginiai gyvybingumo įvertinimui buvo imami eksponentinės augimo fazės metu (22 val.), ankstyvosios (46 val.) ir vėlyvosios stacionariosios (78 val.) stadijos. Gyvybingumas buvo vertinamas dažant ląsteles propidžio jodidu ir po to mikroskopuojant ar atliekant tėkmės citometriją ir nustatant ląstelių gebėjimą formuoti kolonijas.

3.2.1 Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas natūralaus laipsniško mitybinės terpės rūgštėjimo sąlygomis

Ląstelių gyvybingumo įvertinimas mikroskopijos būdu.

Kultivuojant tiriamus mielių kamienus skystose YPD ir YPD-MES terpėse ląstelių gyvybingumas išliko aukštas net ir vėlyvojoje stacionariojoje stadijoje ir varijavo nuo $99,43 \pm 0,26$ % iki $87,97 \pm 4,62$ %. MES komponento įvedimas į mitybinę terpę, nesukėlė ląstelių gyvybingumo pokyčių, todėl buvo naudotas ir SC terpėje.

Ląstelių gyvybingumo skirtumai YPD ir SC terpėse, išryškėjo jau po 46 valandų augimo (18 pav.). YPD terpėje po 46 valandų augimo tiriamų kamienų ląstelių gyvybingumas buvo didesnis nei 96 %, tuo tarpu SC terpėje *Ras2^{Val19}* ir *ΔPDE2* kamienuose jau ankstyvojoje stacionariojoje stadijoje gyvybingumas sumažėjo atitinkamai iki $67,63 \pm 3,364$ % ir $63,80 \pm 0,816$ %. Tai statistiškai patikimas skirtumas palyginus su šių kamienų ląstelių gyvybingumu YPD terpėje ($p < 0,05$). Patikimai mažesnis ląstelių gyvybingumas nustatytas ir visų transformantų kamienuose ir JT21569 kamiene.

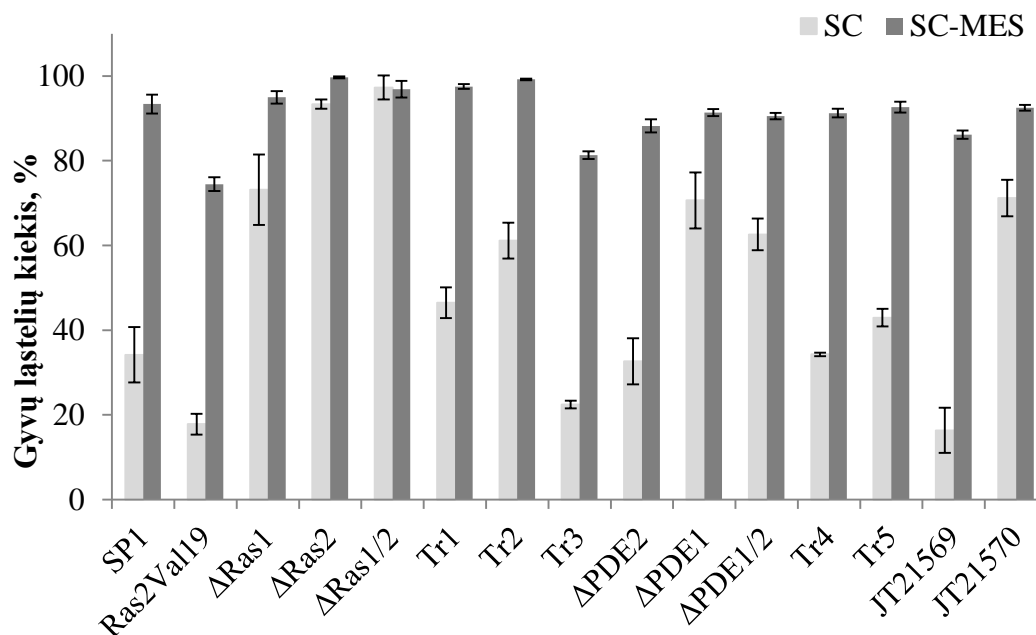


18 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių gyvybingumas po 46 valandų YPD ir SC terpėse.

Palyginus tiriamų kamienų ląstelių gyvybingumą SC terpėje po 46 valandų augimo nustatyta, kad patikimai mažesniu gyvybingumu, palyginus su laukiniu pagal Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą kamieniu, pasižymėjo *Ras2^{Val19}* ląstelės. Kitų kamienų ląstelių gyvybingumas patikimai nesiskyrė nuo SP1.

SC ir SC-MES terpėse, vėlyvojo stacionaro stadijoje, nustatyti dideli ląstelių gyvybingumo pokyčiai (19 pav.). Po 78 valandų kultivavimo augimo SC terpėje net ir laukinio SP1 kamieno ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki $34,17 \pm 6,532$ %. Nuo SP1 kamieno statistiškai nesiskyrė *ΔPDE2*, *Tr4*, *Tr1* ir *Tr5* kamienų ląstelių gyvybingumas. Tuo tarpu konstitutyviai aktyvaus Ras/PKA kelio kamieno (*Ras2^{Val19}* kamienas), *Tr3* transformanto ir *JT21569* kamieno ląstelių gyvybingumas buvo statistiškai patikimai mažesnis palyginus su SP1 ($p < 0,05$), atitinkamai – $17,8 \pm 2,459$ %, $22,45 \pm 0,916$ % ir $16,33 \pm 5,31$ 2%. *Ras2* geno delecija ir žmogaus Ha-ras geno įvedimas sąlygojo ženklų ląstelių gyvybingumo padidėjimą. Net ir po 78 valandų augimo SC terpėje šiuose kamieniuose nustatyta daugiau nei 90 % gyvų ląstelių ($p < 0,001$,

palyginus su SP1). Statistiškai patikimai daugiau gyvų ląstelių identifikuota ir $\Delta Ras1$, $Tr2$, $\Delta PDE1$, $\Delta PDE1/2$, $JT21570$ kamienuose.



19 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių gyvybingumas po 78 valandų SC ir SC-MES terpėse.

Pastovaus pH palaikymas SC terpėje sąlygojo mielių ląstelių gyvybingumo didėjimą (19 pav.). Visuose kamienuose jis buvo statistiškai patikimai didesnis, palyginus su SC terpe po 78 valandų augimo. Mažiausiu gyvybingumu pasižymėjo $Ras2^{Val19}$ kamieno ląstelės ($74,47 \pm 1,621\%$), tuo tarpu kitų kamienų atveju jis išliko virš 80 %. Atliekant tarpkamieninį gyvybingumo palyginimą SC-MES terpėje nustatytas statistiškai patikimai mažesnis ląstelių gyvybingumas $Ras2^{Val19}$, $Tr3$ ir $JT21569$ kamienuose, palyginus su SP1 ($p < 0,05$). Kitų tiriamų kamienų atvejais jis varijavo SP1 pasikliautinųjų intervalų ribose ($p > 0,05$).

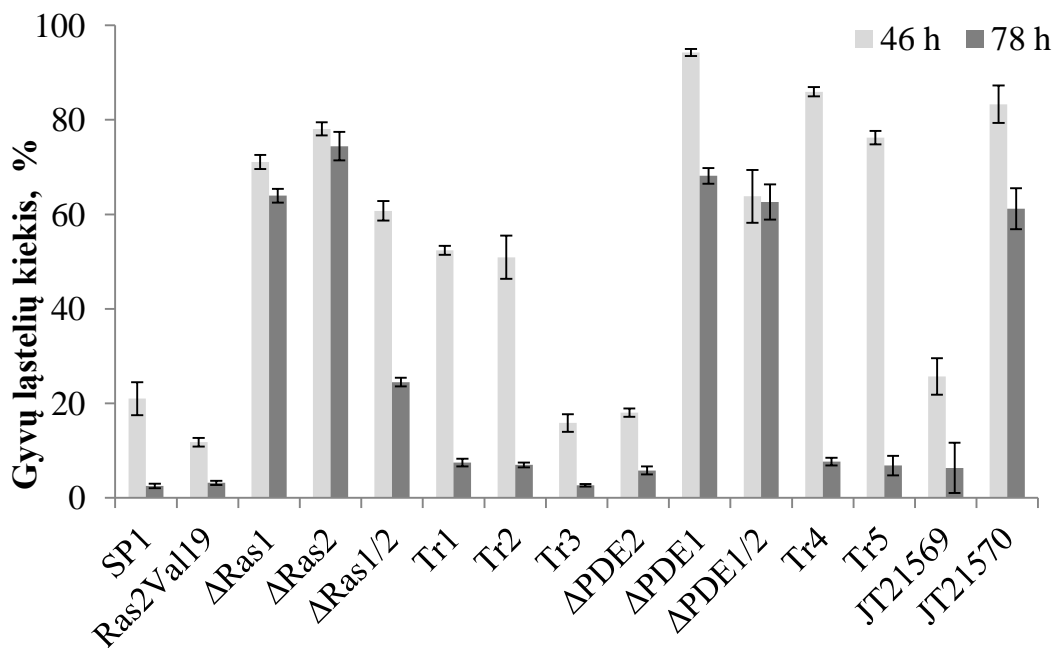
Ląstelių gyvybingumo įvertinimas tėkmės citometrijos būdu.

Mikroskopijos rezultatai buvo patvirtinti ir ląstelių gyvybingumą nustatant tėkmės citometrijos būdu (20 pav.). Po 46 val. augimo mažiausias gyvų ląstelių kiekis buvo nustatytas $Ras2^{Val19}$ kamiene $11,77 \pm 0,893\%$ ($p < 0,05$, palyginus su SP1). Laukinio pagal Ras/PKA signalinio kelio aktyvumą

kamieno ląstelių gyvybingumas buvo $20,99 \pm 3,492$ %, panašus jis nustatytas *Tr3* transformanto – $15,84 \pm 1,872$ %, ir $\Delta PDE2$ ($18,03 \pm 0,878$ %) ir *JT21569* ($25,67 \pm 3,872$ %) kamienų ląstelėse.

Ankstyvojoje stacionariojoje stadijoje statistiškai patikimai didesnis ląstelių gyvybingumas registruotas $\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$, *Tr1*, *Tr2*, $\Delta PDE1$, $\Delta PDE1/2$, *Tr4*, *Tr5* ir *JT21570* kamienuose, palyginus su SP1. Visuose kamienuose po 78 valandų augimo nustatytas statistiškai patikimai mažesnis ląstelių gyvybingumas nei po 46 val. Išimtį sudaro tik $\Delta Ras2$ ir $\Delta PDE1/2$ kamieniai, kuriuose gyvų ląstelių kiekis kito nežymiai.

Tėkmės citometrijos būdu SP1 ir *Ras2^{Val19}* kamienuose nustatytas itin mažas gyvų ląstelių kiekis, tik $2,53 \pm 0,479$ % ir $3,17 \pm 0,449$ % atitinkamai.



20 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių gyvybingumas SC terpėje po 46 ir 78 valandų augimo įvertintas tėkmės citometrijos būdu.

Transformantų kamienuose (*Tr1*, *Tr2*, *Tr3*, *Tr4*, *Tr5*) gyvų ląstelių kiekis svyravo apie 6 %, panašus jis buvo ir $\Delta PDE2$ ir *JT21569* kamienuose ($5,79 \pm 0,829$ %, $6,33 \pm 5,312$ %). *Ras* genų delecijos sukėlė ryškų ląstelių gyvybingumo padidėjimą. Ląstelių gyvybingumas $\Delta Ras1$ kamiene buvo 63,94

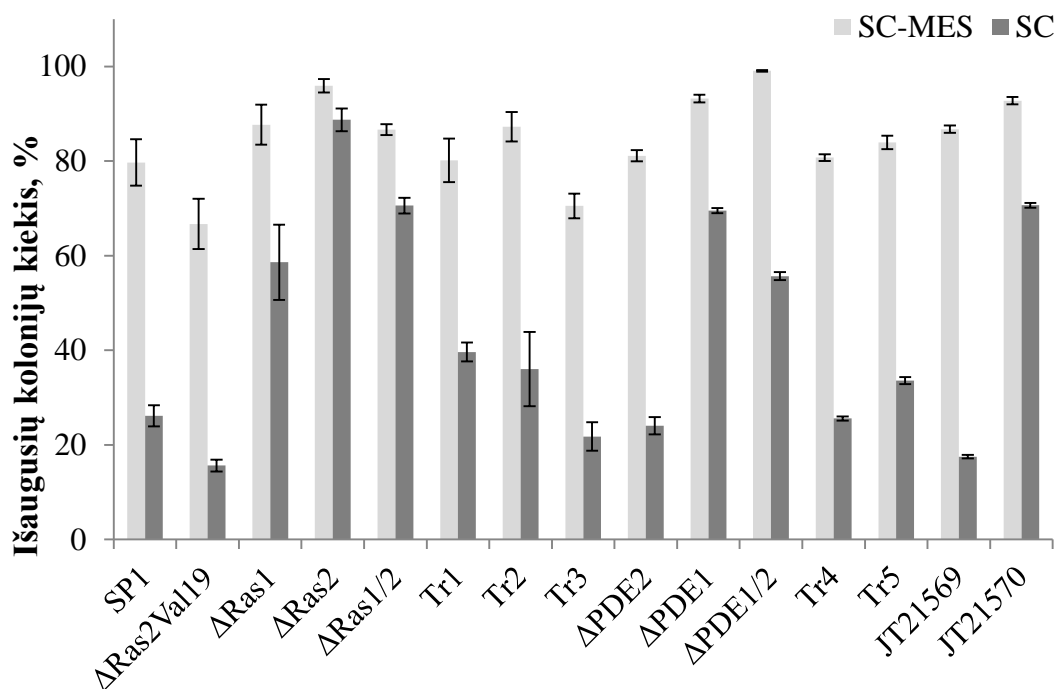
$\pm 1,462$ %, $\Delta Ras2 - 74,41 \pm 3,025$ %, o $\Delta Ras1/2 - 24,49 \pm 0,925$ %. Ženkliai didesnis ląstelių gyvybingumas nustatytas ir kamienuose inaktyvius *PDE1* geną ir abu *PDE* genus ($\Delta PDE1 - 68,15 \pm 1,647$ %, $\Delta PDE1/2 - 62,60 \pm 3,750$ %). *JT21570* kamiene, turinčiame PKA mutaciją ir papildomą *PDE2* geno kopiją taip pat nustatytas statistiškai patikimai didesnis ląstelių gyvybingumas – $61,20 \pm 4,330$ %, palyginus su SP1 kamienu ($p < 0,001$).

Vertinant ląstelių gyvybingumą tėkmės citometrijos būdu, buvo nustatytas ženklus ląstelių gyvybingumo padidėjimas SC terpėje pastovaus pH sąlygomis. Palyginus ląstelių gyvybingumą YPD ir YPD-MES terpėse, patikimų skirtumų nenustatyta. Bendrai visuose kamienuose tėkmės citometrijos būdu nustatytas ląstelių gyvybingumas buvo mažesnis nei nustatytas mikroskopuojant. Tačiau bendros ląstelių gyvybingumo tendencijos išliko tokios pat. Skirtingi rezultatai gauti skirtingo metodų jautrumo.

Kamienu įvertinimas pagal gebėjimą formuoti kolonijas.

Kolonijų formavimo gebėjimui patikrinti žinomas ląstelių kiekis buvo išsėjamas ant YPD terpės. Išsėjus tokį patį suspensijos kiekį, kolonijas gebančių formuoti ląstelių kiekis YPD ir YPD-MES terpėse, nepriklausomai nuo augimo valandos, išliko per 90 %.

Eksperimentų rezultatai po augimo SC terpėse pateikiami 21 paveiksle. $26,13 \pm 2,231$ % SP1 kamieno ląstelių po 78 val. augimo SC terpėje formavo kolonijas perkėlus ląsteles ant YPD mitybinės terpės. Panašus kolonijas formuojančių ląstelių kiekis nustatytas ir *Tr2*, *Tr3*, *Tr4* transformantuose ir $\Delta PDE2$ kamiene. Statistiškai patikimai mažiau kolonijas formuojančių ląstelių aptikta *Ras2^{Val19}* ir *JT21569* kamienuose ($15,63 \pm 1,247$ % ir $17,50 \pm 0,378$ %). Šiek tiek didesnis palyginus su SP1 gyvybingų ir kolonijas formuojančių ląstelių kiekis nustatytas *Tr5* ir *Tr1* transformantuose. Tuo tarpu *Ras1*, *Ras2* ir abiejų *Ras* genų pašalinimas sąlygojo ženklų ląstelių gyvybingumo padidėjimą: $58,60 \pm 7,931$ % $\Delta Ras1$, $88,73 \pm 2,423$ % $\Delta Ras2$ ir $70,60 \pm 1,651$ % $\Delta Ras1/2$ ląstelių po 78 val. augimo išliko gyvos ir gebėjo suformuoti kolonijas turtingoje terpėje.



21 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių, formuojančių kolonijas, kiekis išsėjus ląsteles YPD terpėje po 78 val augimo SC ir SC-MES terpėse.

Fosfodiesterazės 1 geno delecija taip pat sąlygojo panašų, kolonijas formuojančių ląstelių kiekį. Kolonijas formavo $69,51 \pm 0,550$ % $\Delta PDE1$ ir $55,68 \pm 0,827$ % $\Delta PDE1/2$ kamienų ląstelių. Įvedus papildomą $PDE2$ geno kopiją į proteinkinazės A mutaciją turintį kamieną, kolonijas formuojančių ląstelių kiekis pasiekė statistiškai patikimą padidėjimą, palyginus su SP1, $70,66 \pm 0,494$ % ($p < 0,05$).

Gauti rezultatai rodo, kad palaikius SC terpėje pastovų pH buvo pailgintas ląstelių amžius ir ląstelių gyvybingumas ženkliai išaugo. Mažiausias kolonijas formuojančių ląstelių skaičius nustatytas $Ras2^{Val19}$ ir $Tr3$ kamienuose, viršijo 60 %. Kituose kamienuose gyvų ląstelių skaičius svyravo apie 80%, o $\Delta Ras2$, $\Delta PDE1$, $\Delta PDE1/2$ ir $JT21570$ kamienuose buvo didesnis nei 90 %.

Tiriamų kultūrų augimo rūgštėjančioje terpėje ir jų ląstelių gyvybingumo analizės rezultatai rodo, kad Ras/PKA signalinio kelio komponentų genų mutacijos įtakoja ląstelių gyvybingumą priklausomai nuo aplinkos pH. Tai rodo, kad šis signalinis kelias, priklausomai nuo aplinkos pH,

gali būti teigiamu arba neigiamu ląstelių gyvybingumą kontroliuojančių genetinių sistemų reguliatoriumi. Siekiant patvirtinti šią hipotezę buvo atlikti rūgštinio streso indukcijos eksperimentai.

3.2.2 Mielių ląstelių gyvybingumo įvertinimas rūgštinio streso sąlygomis.

Rūgštinio streso eksperimentai buvo atlikti naudojant ląstelių inkubacijai 5,4 pH ir 2,1 pH sorbitolio tirpalus. Toks pH buvo parinktas atsižvelgiant į SC terpės natūralų pH kitimą. Žioma, kad pradinis SC terpės pH yra 5,4, o kamienų augimo metu mažiausias pH buvo 2,1. Inkubacijos trukmės parinkimui ląstelės tirpaluose buvo laikomos nuo 1 iki 8 valandų. Ryškiausias gyvybingumo skirtumas tarp kamienų buvo stebimi ląstelės inkubavus būtent 4 ir 6 valandas, todėl tolesniems rūgštinio streso tyrimams buvo pasirinktos būtent tokios sąlygos.

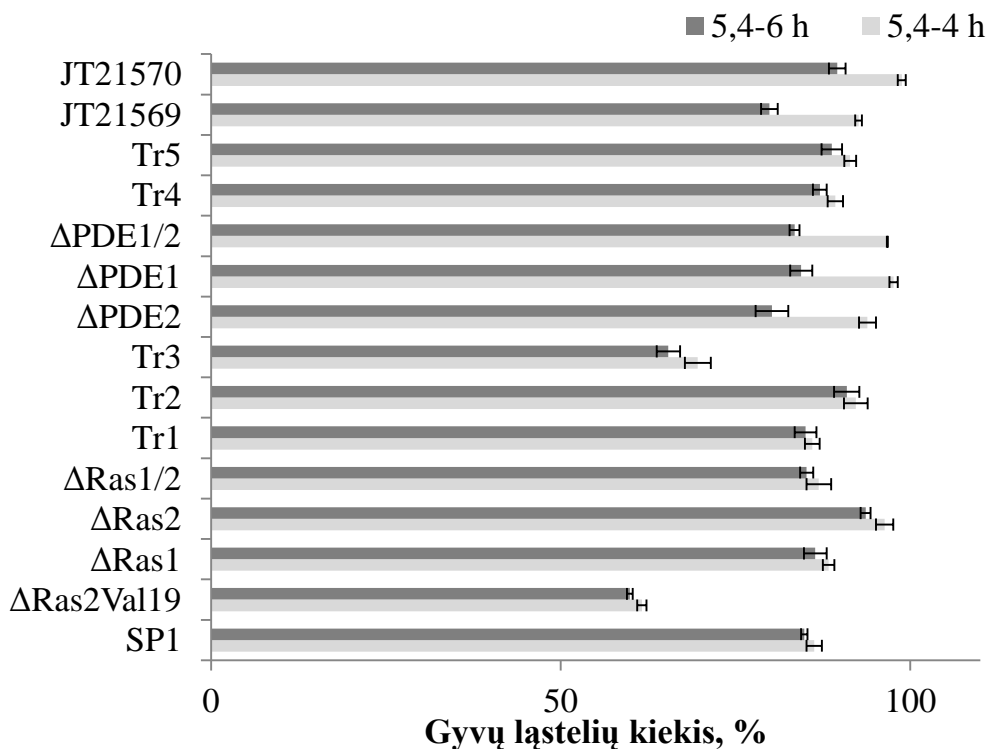
Ląstelių gyvybingumo įvertinimas mikroskopijos būdu.

$86,23 \pm 1,103\%$ SP1 kamieno ląstelių išliko gyvybingos po 4 val. inkubavimo pH 5,4 tirpale. Inkubacijos laiko ilginimas iki 6 val. SP1 kamieno ląstelių gyvybingumui įtakos neturėjo – gyvybingomis išliko $84,83 \pm 0,450\%$ ląstelių (22 pav.).

RAS genų mutacijas turinčiuose kamienuose ir transformantuose (*Tr1*, *Tr2*, *Tr4*, *Tr5*) inkubacijos laikas neįtakoją kontroliniame tirpale inkubuotų ląstelių gyvybingumo, ilginant inkubacijos laiką, ląstelių gyvybingumas kito nežymiai. Mažiausias ląstelių gyvybingumas nustatytas konstitutyviai aktyvaus Ras/PKA signalinio kelio kamienne ir šio kamieno transformante *Tr3* ir svyravo atitinkamai apie 60 % ir 65 %.

Gauti rezultatai rodo, kad ilgėjant ląstelių inkubavimo laikui kontroliniame tirpale, fosfodiesterazes koduojančių genų eliminacija sukelia statistiškai patikimus ląstelių gyvybingumo pokyčius. Tačiau ir po 6 val. inkubavimo ląstelių gyvybingumas išliko pakankamai didelis – per 80 %. Panašūs rezultatai gauti ir PKA mutantų atveju. Tiek įterpus papildomą *PDE1* (*JT21569*), tiek ir *PDE2* (*JT21570*) geno kopijas į PKA mutantus ląstelių

gyvybingumas statistiškai patikimai mažėjo priklausomai nuo inkubavimo laiko 5,4 pH tirpale.

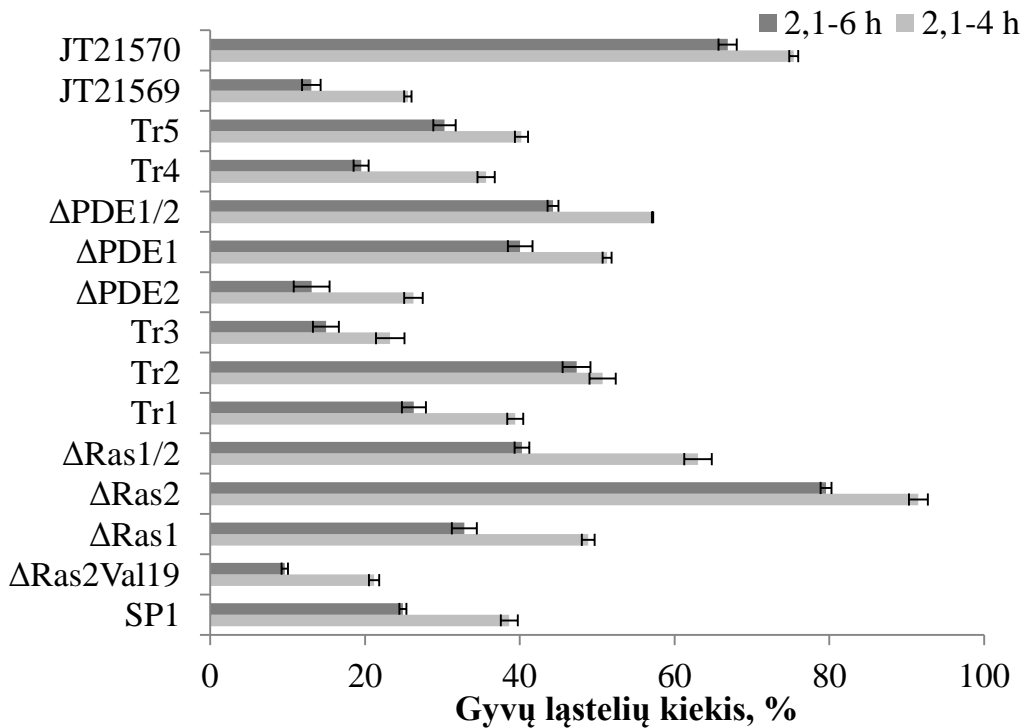


22 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių gyvybingumas 5,4 pH tirpale po 4 val. ir 6 val. inkubacijos. Vertinimas atliktas mikroskopijos būdu.

Ląstelių gyvybingumas ženkliai mažėjo po inkubacijos 2,1 pH tirpale (23 pav.). Visų kamienų ląstelių gyvybingumas mažėjo ilgėjant inkubacijos laikui. Jau po 4 val. inkubavimo tik $38,63 \pm 3,309$ % SP1 kamieno ląstelių išliko gyvos. Panašus gyvų ląstelių kiekis aptinktas ir *Tr1* ($39,40 \pm 1,551$ %), *Tr4* ($35,65 \pm 0,858$ %) ir *Tr5* ($40,21 \pm 1,552$ %) transformatuose. Statistiškai patikimas ląstelių gyvybingumo sumažėjimas, palyginus su laukiniu kamieniu, nustatytas *Ras2^{Val19}*, *PDE2* ir *JT21569* kamienų ląstelėse, ir *Ras2^{Val19}* kamieno transformante *Tr3*, atitinkamai jis buvo lygus $21,17 \pm 1,725$ %, $26,27 \pm 2,640$ %, $25,54 \pm 0,730$ %, $23,24 \pm 1,516$ %.

Statistiškai patikimai daugiau gyvų ląstelių buvo nustatyta *RAS* genų delecijas turinčiuose kamieniuose: *ΔRas1* – $48,83 \pm 1,167$ %, *ΔRas2* – $91,50 \pm 21,28$ %, *ΔRas1/2* – $63,03 \pm 2,941$ %. *ΔRas2* kamieno transformacija vidutinį kopijų skaičių turinčia plazmide (*Tr2*) nesugebėjo užtikrinti pilno *RAS2*

funkcijos atstatymo, ląstelių gyvybingumas rūgštinio streso sąlygomis nepasiekė SP1 lygio ir liko statistiškai patikimai didesnis ($50,70 \pm 2,790 \%$; $p < 0,05$)



23 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių gyvybingumas pH 2,1 tirpale po 4 val. ir 6 val. inkubacijos įvertintas mikroskopijos būdu.

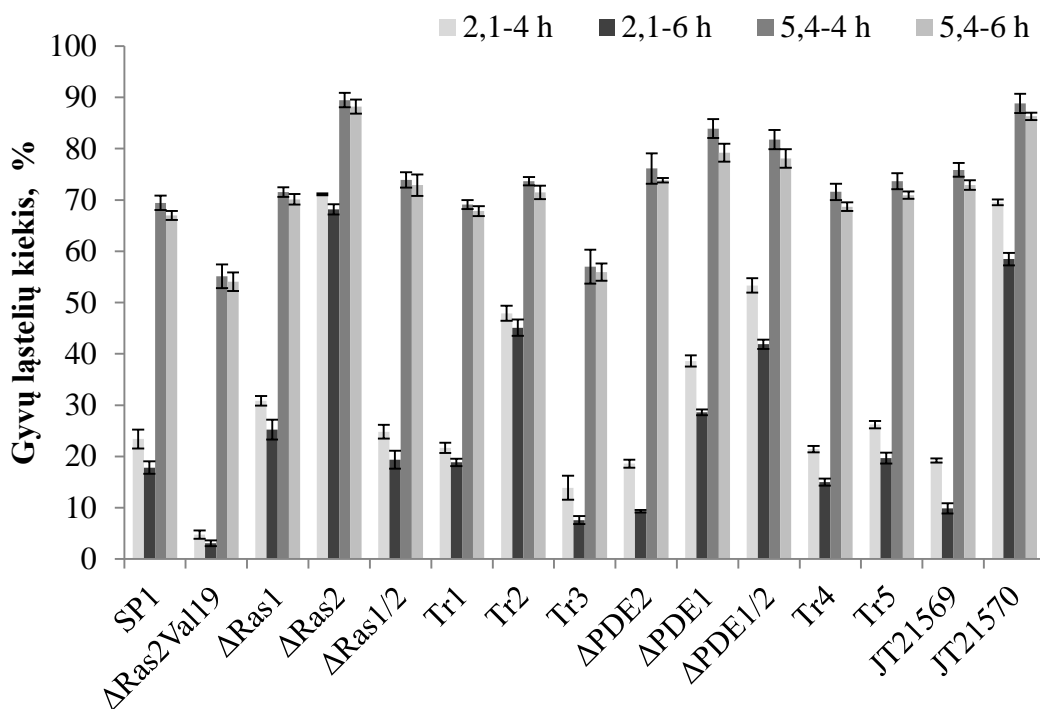
Ląstelių atsparumą rūgštiniam stresui didino ir fosfodiesterazę 1 koduojančio geno inaktyvinimas. Ląstelių gyvybingumas $\Delta PDE1$ ir $\Delta PDE1/2$ kamienuose buvo $51,29 \pm 1,274 \%$ ir $57,15 \pm 1,488 \%$, tai statistiškai patikimas padidėjimas, palyginus su SP1 ($p < 0,05$). Papildomos $PDE2$ kopijos įvedimas į PKA mutaciją turintį kamieną sąlygojo ir patikimą šio kamieno ląstelių gyvybingumo padidėjimą – $75,40 \pm 2,260 \%$ ($p < 0,001$, palyginus su SP1).

Kaip jau minėta, inkubavimo laiko patęsimas iki 6 val. visuose kamienuose, išskyrus $Tr2$ transformantą, sukėlė patikimą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą. Po 6 val. inkubavimo beveik visuose kamienuose nustatytas apie 15% mažesnis ląstelių gyvybingumas, palyginus su gyvų ląstelių kiekiu po 4 val. Po 6 val. gyvos išliko $24,90 \pm 1,791\%$ SP1 kamieno ląstelių. Mažiausias

ląstelių gyvybingumas nustatytas $Ras2^{Val19}$ kamiene – $9,63 \pm 0,624\%$, o didžiausias $\Delta Ras2$ – $79,57 \pm 2,613\%$.

Ląstelių gyvybingumo įvertinimas tėkmės citometrijos būdu.

Įvertinus ląstelių gyvybingumą tėkmės citometrijos pagalba gauti panašūs rezultatai kaip ir atlikus mikroskopiją (24 pav.). Tėkmės citometrijos rezultatai patvirtino ląstelių išgyvenamumo tendencijas, gautas mikroskopuojant. Kaip ir ankstesniuose eksperimentuose, taip ir rūgštinio streso atveju, tėkmės citometrijos metodu gauti ląstelių gyvybingumo rezultatai yra keliolika procentų žemesni, palyginus su mikroskopijos rezultatais.



24 pav. Kamienų su pakitusiu Ras/PKA signalinio kelio aktyvumu ląstelių gyvybingumas rūgštinio streso sąlygomis įvertintas tėkmės citometrijos metodu. Ląstelės inkubuotos pH 5,4 ir 2,1 tirpaluose 4 ir 6 val.

SP1 kamieno ląsteles inkubavus pH 5,4 tirpale, jų gyvybingumas išliko $66,97 \pm 0,873 \%$. Panašiu gyvybingumu pasižymėjo ir $\Delta Ras1$, $\Delta Ras1/2$, $Tr1$, $Tr2$, $Tr4$, $Tr5$ kamienų ląstelės. Nežymiai didesnis ląstelių gyvybingumas nustatytas $\Delta PDE2$ ir $JT21569$ kamienuose ($p > 0,05$, palyginus su SP1).

ΔRas2, *ΔPDE1*, *ΔPDE1/2* ir *JT21570* kamienų atvejais šis padidėjimas buvo statistiškai patikimas palyginus su SP1 kamieno ląstelių gyvybingumu. Statistiškai patikimai mažiau gyvų ląstelių nustatyta *Ras2^{Val19}* ir *Tr3* kamienuose, atitinkamai – $55,13 \pm 2,330$ % ir $56,99 \pm 3,332$ % po 4 val. inkubavimo pH 5,4 tirpale. Pratęsus inkubacijos laiką iki 6 val. nė viename kamienne nebuvo stebima koreliacija su ląstelių gyvybingumo sumažėjimu.

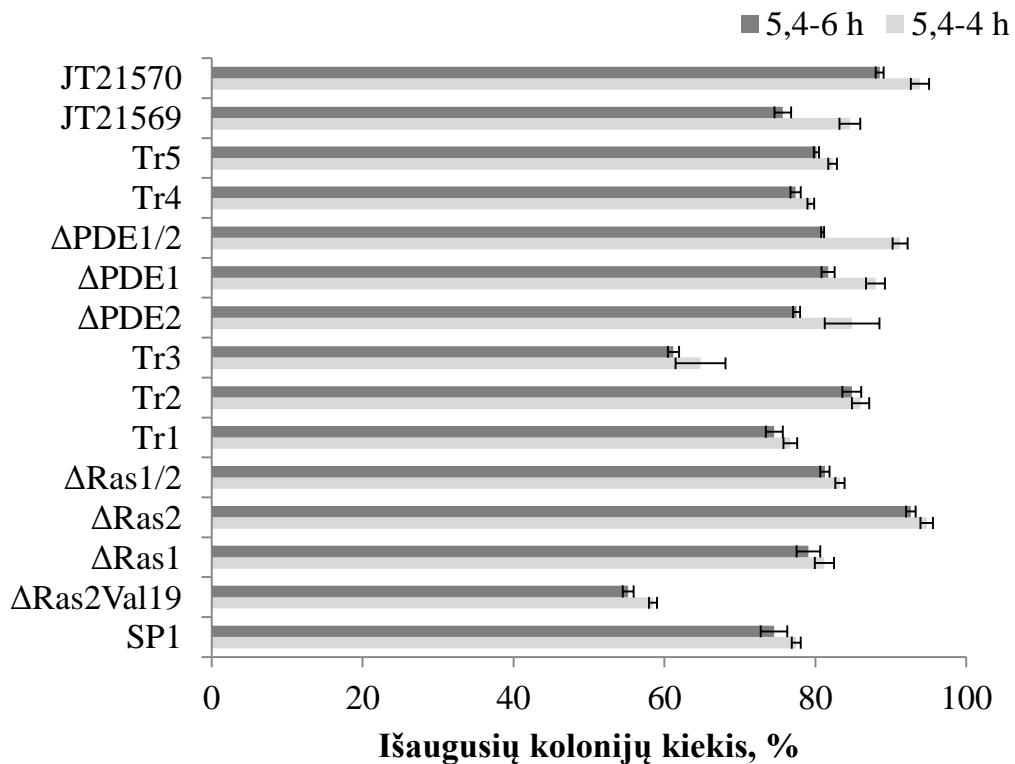
Rūgštinio streso sąlygomis ląstelių gyvybingumas tirtuose kamienuose ženkliai variavo. Įvertinus ląstelių gyvybingumą tėkmės citometrijos metodu, kaip ir mikroskopijos atveju didžiausias jis išliko *ΔRas2* ir *JT21570* kamienuose. *ΔRas1*, *ΔRas1/2*, *Tr4*, *Tr5*, *JT21569* kamienuose ląstelių gyvybingumas svyravo SP1 kamieno rezultatų patikimumo ribose, o *Ras2^{Val19}* ir *ΔPDE2* kamienuose buvo statistiškai patikimai mažesnis ($p < 0,05$).

Paminėtina tai, kad atliekant tėkmės citometriją nebuvo nustatytas toks ryškus ląstelių gyvybingumo sumažėjimas ilginant inkubacijos laiką, kaip mikroskopijos metodu, tačiau beveik visuose kamienuose šis pokytis išliko statistiškai patikimas.

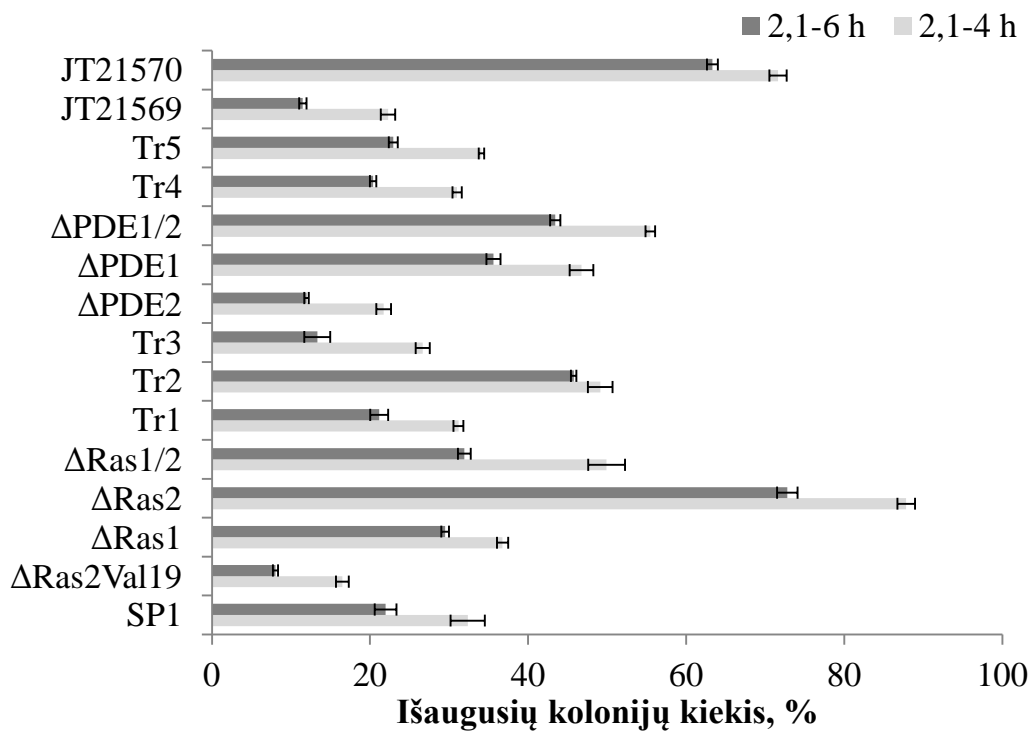
Kamienų įvertinimas pagal gebėjimą formuoti kolonijas.

Siekiant įvertinti gyvų ląstelių replikacinį potencialą, po inkubacijos pH 5,4 ar 2,1 pH tirpaluose, buvo atlikti gebėjimo formuoti kolonijas tyrimai. Po rūgštinio streso žinomas ląstelių kiekis buvo išsėjamos ant YPD terpės ir po 2 parų suskaičiuojamos išaugusios kolonijos.

Didžiausiu replikaciniu potencialu tiek po 4, tiek ir po 6 val. inkubacijos kontroliniame pH 5,4 tirpale pasižymėjo *ΔRas2* kamienas (25 pav.). Daugiau kaip 90 % šio kamieno ląstelių gebėjo formuoti kolonijas. Tokiu gebėjimu pasižymėjo ir per 75 % laukinio SP1 kamieno ląstelių. Panašus, kaip ir SP1 kamieno, kolonijas formuojančių ląstelių kiekis nustatytas *ΔRas1*, *ΔRas1/2*, *Tr1*, *ΔPDE2*, *Tr4*, *Tr5* ir *JT21569* kamienuose. Patikimai daugiau kolonijas formuojančių ląstelių aptikta *ΔPDE1*, *ΔPDE1/2* ir *JT21570* kamienuose. Kita vertus *Ras2^{Val19}* ir *Tr3* kamienų ląstelės formavo statistiškai patikimai mažiau kolonijų, palyginus su SP1.



25 pav. Kolonijas formuojančių ląstelių kiekis populiacijoje po 4 val. ir 6 val. inkubavimo pH 5,4 tirpale.



26 pav. Kolonijas formuojančių ląstelių kiekis populiacijoje po 4 val. ir 6 val. inkubavimo pH 2,1 tirpale.

Inkubavus mielių ląsteles pH 2,1 tirpale, jų gyvybingumas ženkliai sumažėjo (26 pav.). SP1 kamienne atitinkamai po 4 val. ir 6 val. inkubacijos nustatyta $32,37 \pm 2,164$ % ir $21,97 \pm 1,382$ % kolonijų. Statistiškai patikimai mažiau kolonijas formuojančių ląstelių nustatyta *Ras2^{Val19}* ir *Tr3* kamienuose, po 4 val. ir 6 val. inkubacijos atitinkamai – $16,50 \pm 0,804$ % ir $8,03 \pm 0,330$ % ir $26,67 \pm 0,892$ % ir $13,32 \pm 1,643$ %. Panašus kolonijų skaičius nustatytas *ΔPDE2* – $21,73 \pm 0,923$ % ir $11,95 \pm 0,290$ % ir *JT21569* kamienuose – $22,27 \pm 0,929$ % ir $11,49 \pm 0,461$ %.

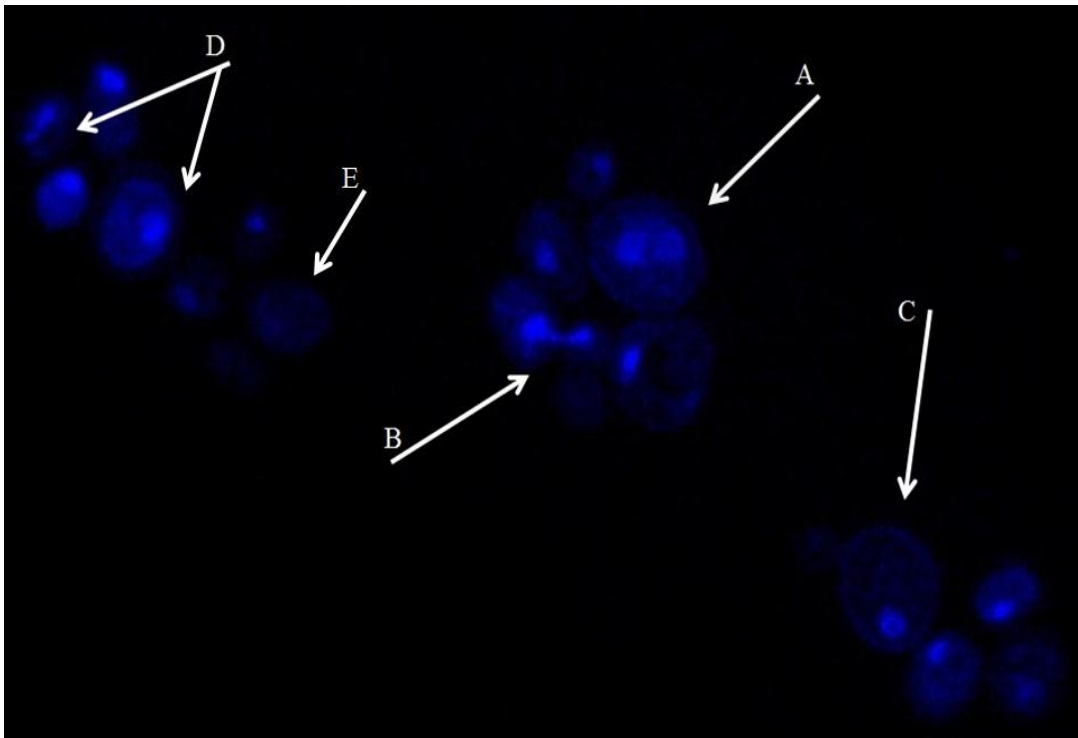
ΔRas2 kamieno atveju, netgi $87,83 \pm 1,115$ % ląstelių gebėjo formuoti kolonijas po 4 val. ir – $72,80 \pm 1,314$ % po 6 val. inkubacijos. Dideliu kolonijas formuojančių ląstelių kiekiu pasižymėjo ir *JT21570* kamienas: po 4 val. inkubacijos gyvos išliko ir dalintis sugebėjo $71,63 \pm 1,095$ %, o po 6 val. – $63,33 \pm 0,682$ %. Statistiškai patikimai daugiau kolonijas formuojančių ląstelių, palyginus su SP1, nustatyta *ΔRas1/2* – $49,93 \pm 2,310$ % ir $31,93 \pm 0,806$ %, *Tr2* – $49,14 \pm 1,560$ % ir $45,77 \pm 0,340$ %, *ΔPDE1* – $46,76 \pm 1,511$ % ir $35,62 \pm 0,898$ %, *ΔPDE1/2* – $55,46 \pm 0,610$ % ir $43,42 \pm 0,647$ % kamienuose, atitinkamai po 4 val. ir 6 val. inkubacijos. Tuo tarpu *ΔRas1*, *Tr1*, *Tr4* ir *Tr5* kamienų gebėjimas formuoti kolonijas buvo toks pat kaip ir SP1. Paminėtina tai, kad visų kamienų gebėjimas formuoti kolonijas mažėjo tiesiogiai priklausomai nuo ląstelių inkubacijos rūgštinio šoko sąlygomis laiko.

Ras/PKA signalinio kelio komponentai daro skirtingą įtaką ląstelių gyvybingumui tiek laipsniško terpės rūgštėjimo, tiek ir rūgštinio streso metu. *RAS* genai ir fosfodiesterazė1 mielių ląstelėse veikia kaip neigiami gyvybingumo rūgštinėmis sąlygomis reguliatoriai, o fosfodiesterazė 2, priešingai, teigiamai veikia ląstelių gyvybingumą. Ląstelių gyvybingumo analizė leido įvertinti mutacijų šio kelio komponentuose įtaką mielių gebėjimui išgyventi ir daugintis jų pačių natūraliai susikurtoje aplinkoje ir rūgštinio streso sąlygomis.

3.3 Apoptozės fenotipų nustatymas pakitusio Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo kamienuose

3.3.1 Branduolių morfologijos pokyčių įvertinimas

Branduolio morfologijos pakitimai yra vienas iš citologinių apoptozės žymenų mielių ląstelėse (27 pav.). Jie buvo įvertinti mielių branduolius dažant DAPI dažais.



27 pav. Branduolio morfologijos pavyzdžiai, gauti konfokalinės mikroskopijos pagalba. A – dvibranduolė ląstelė, B – besipumpuruojanti ląstelė, C – ląstelė su normaliu branduoliu, D – branduolio fragmentacija, E – difuzinis branduolys.

Mielių kultūroms augant YPD ir YPD-MES terpėse, branduolių fragmentacija buvo stebima mažiau nei 1 % ląstelių. Tuo tarpu auginant tiriamuosius kamienus SC terpėje, branduolių morfologija labai variavo (8 lentelė). Buvo aptiktos skirtingos branduolio struktūros: įvairaus lygio branduolio fragmentacija, poriniai branduoliai, difuziniai branduoliai, dar kitaip vadinami kompaktišką struktūrą praradusiais branduoliais ir kiti pakitimai.

8 lentelė. Branduolių morfologijos įvertinimas mielių ląstelėse po 78 valandų augimo SC terpėje.

Kamienas	Branduolių morfologija			
	Normalūs	Fragmentuoti	Dvibranduoliai	Kiti pakitimai
<i>SP1</i>	31,77±5,23	52,56±7,58	5,13±1,01	10,54±2,56
<i>Ras2^{Val19}</i>	29,96±4,28	54,32±8,56	5,41±1,54	10,31±2,84
Δ <i>Ras1</i>	27,23±5,16	43,86±7,23	2,41±0,84	26,50±3,44*
Δ <i>Ras2</i>	43,48±5,62	17,39±5,45**	33,09±3,26*	6,04±1,59
Δ <i>Ras1/2</i>	32,31±3,12	30,77±4,56**	23,85±2,85*	13,07±3,45
<i>Tr1</i>	28,75±4,96	55,21±4,98	5,69±1,20	10,35±3,86
<i>Tr2</i>	23,81±7,56	53,33±6,85	9,52±3,45	13,34±3,15
<i>Tr3</i>	33,33±2,36	51,21±7,59	5,15±1,09	10,31±2,46
Δ <i>PDE2</i>	29,17±4,56	50,00±8,53	4,17±1,11	16,66±2,86
Δ <i>PDE1</i>	32,09±8,51	25,65±9,48**	5,12±1,85	37,14±5,84*
Δ <i>PDE1/2</i>	31,48±7,56	42,59±8,56	5,56±1,76	20,37±4,52*
<i>Tr4</i>	29,81±3,15	57,52±8,93	2,24±0,87	10,43±2,23
<i>Tr5</i>	28,78±5,48	48,32±7,23	1,98±1,01	20,92±4,51*
<i>JT21569</i>	22,45±6,23	65,53±9,54	2,02±1,43	10,00±1,98
<i>JT21570</i>	20,18±8,75	58,27±7,86	4,55±1,59	17,00±2,75*

* statistiškai patikimas padidėjimas ($p < 0,05$), palyginus su SP1 kamieniu.

** statistiškai patikimas sumažėjimas ($p < 0,05$), palyginus su SP1 kamieniu.

Prie kitų branduolio morfologijos pakitimų yra priskiriamos ląstelės, kurios neturi vizualiai matomo branduolio, taip pat ląstelės su taip vadinamais difuziniais arba kompaktišką struktūrą praradusiais branduoliais. Statistiškai patikimai daugiau įvairių branduolio struktūros pakitimų palyginus su SP1 kamieno rezultatais nustatyta Δ *Ras1*, Δ *PDE1*, Δ *PDE1/2*, *Tr5* ir *JT21570* kamienų ląstelėse.

Beveik visų kamienų ląstelių fragmentuotų branduolių kiekis varijavo SP1 kamieno rezultatų patikimumo ribose. Statistiškai patikimai mažiau fragmentuotų branduolių buvo nustatyta Δ *Ras2*, Δ *Ras1/2*, Δ *PDE1* kamienuose ($p < 0,05$).

Pažymėtina, kad *Ras2* geno delecija sąlygojo didelio kiekio dvibranduolių ląstelių (27 pav.) atsiradimą $33,09 \pm 3,26$ % ($p < 0,05$, palyginus

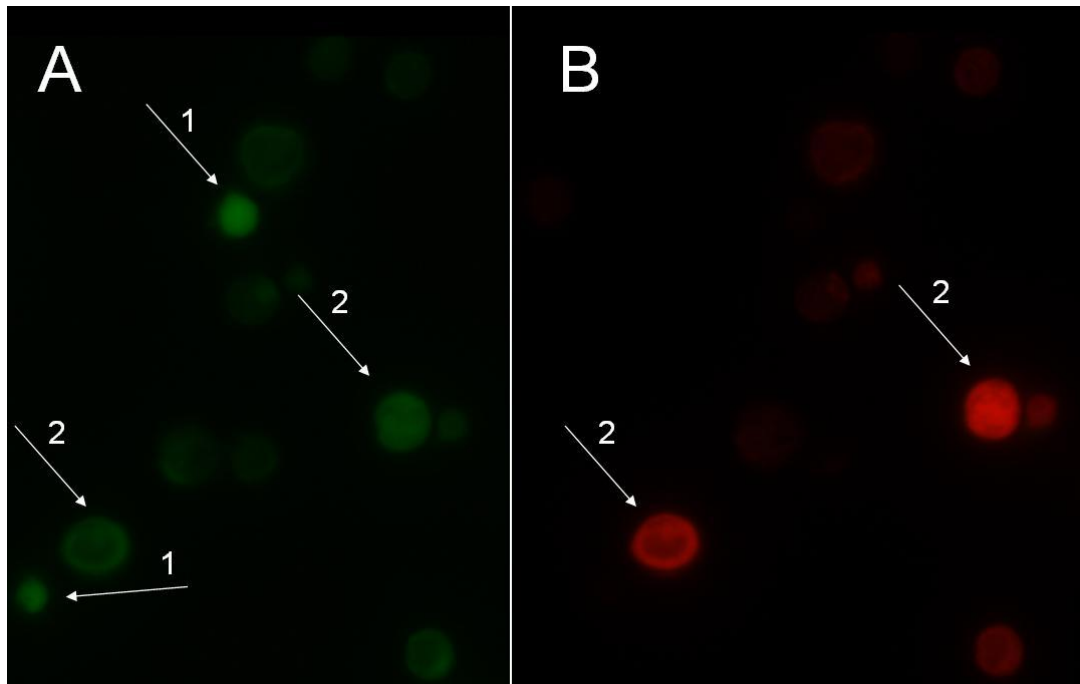
su SP1), padidėjęs dvibranduolių ląstelių kiekis išliko ir mielių *RAS1*, ir *RAS2* genus pakeitus Ha-ras $23,85 \pm 2,85$ % ($p < 0,05$, palyginus su SP1). Porinių branduolių atsiradimo priežastimi gali būti endomitozė (Pichova ir kt., 1997; Lun ir kt., 2001). Manoma, kad tokios struktūros gali būti ir dėl simetriškos branduolio fragmentacijos (Madeo ir kt., 1997). Būtent šie du kamienai pasižymėjo itin aukštu ląstelių gyvybingumu tiek laipsniško rūgštėjimo, tiek ir rūgštinio streso sąlygomis. Tai rodo, kad tokio tipo branduolio pakitimai nebūtinai yra susiję su ląstelių mirtingumu, ir juos turinčios ląstelės gali sėkmingai funkcionuoti. Didelis kamienų atsparumas stresui gali būti siejamas su endomitoze. Dvigubo genomo egzistavimas vienoje ląstelėje leidžia jai geriau prisitaikyti prie stresinių aplinkos sąlygų.

Branduolio fragmentacija – tai ankstyvosios apoptozės fenotipinis požymis. Todėl jos tyrimai leidžia įvertinti šios apoptozės stadijos formavimąsi mielėse. Dalis tokių apoptozinių pažeidimų perkėlus ląsteles į geresnes sąlygas gali būti ištaisomi, todėl branduolio fragmentacija nebūtinai tiesiogiai koreliuoja su ląstelių gyvybingumu.

3.3.2 Fosfatidilserino lokalizacijos nustatymas.

Fosfatidilserinas tai plazminės membranos komponentas, kuris normaliose ląstelėse yra lokalizuotas vidinėje ląstelės membranos pusėje. Ląstelėms mirštant apoptozės būdu, ši simetrija sutrinka ir fosfatidilserino molekulės yra dislokuojamos plazminės membranos išorėje. Toks lokalizacijos pasikeitimas buvo nustatomas dažant mielių ląsteles aneksinu, konjuguotu su FITC (28 pav.). Papildomo fluorescuojančio dažo, propižio jodido, panaudojimas padeda atskirti apoptotines ląsteles nuo nekrozių.

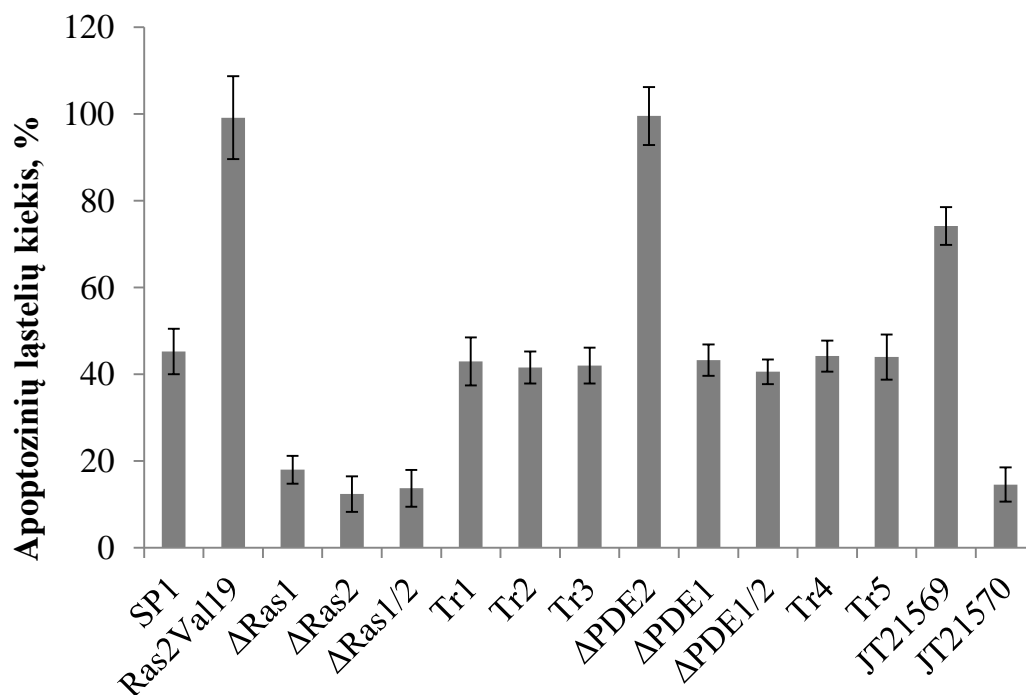
Fosfatidilserino lokalizacijos įvertinimui mielių kamienai buvo auginti YPD ir YPD-MES terpėse. Po 78 valandų augimo apoptozinių ląstelių kiekis visuose analizuotuose kamienuose sudarė apie 1 %.



28 pav. Dvigubas ląstelių dažymas – mielių ląstelės nudažytos annexinV-FLUOS (A) ir propidžio jodidu (B). Ankstyvosios apoptozės fenotipai (1) identifikuojami pagal fosfatidilserino atsiradimą plazminės membranos išorėje, tokios ląstelės nusidažo aneksinu (žaliai) bet ne propidžio jodidu (raudonai). Ląstelių dažymasis abiem dažais rodo nekrozę (2), pažeista plazminė membrana tampa laidi ir dažai lengvai patenka į ląstelės vidų.

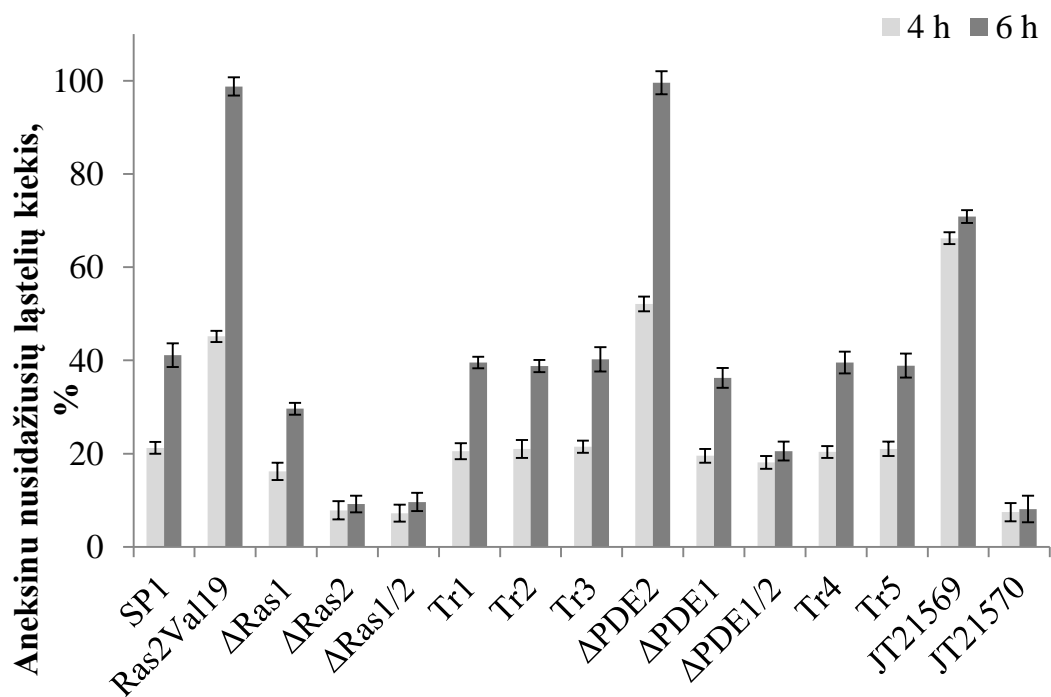
Tuo tarpu SC terpėje po 78 valandų augimo ankstyvąją apoptozę patyrė $32,82 \pm 0,98$ % SP1 kamieno ląstelių. Didžiausias apoptozinių ląstelių kiekis šiomis sąlygomis buvo stebimas *Ras2^{Val19}* ir *ΔPDE2* kamienų ląstelėse, atitinkamai – $95,14 \pm 1,02\%$ ir $90,00 \pm 1,23$ %. Šiek tiek mažesnis apoptozinių ląstelių kiekis ($54,00 \pm 0,45$ %) buvo nustatytas *JT20569* kamiene. Tai statistiškai patikimai didesnis gyvybingumas palyginus su SP1 kamienu ($p < 0,05$). Fosfatidilserino lokalizacijos sutrikimai *ΔRas2*, *ΔRas1*, *ΔRas1/2* kamienuose svyravo nuo $4,82 \pm 0,54$ % iki $3,68 \pm 0,68$ %. Panašus apoptozinių ląstelių procentas buvo stebimas *JT21570* kamiene ($4,00 \pm 0,85$ %). Fosfodiesterazės 1 delecija sukėlė apoptozę $35,42 \pm 0,98$ % ląstelių, o abiejų fosfodiesterazių genų delecija – $18,00 \pm 1,01$ %. Transformantuose apoptozinių ląstelių procentas svyravo SP1 kamieno patikimumo ribose – apie 30 %.

Fosfatidilserino lokalizacijos pasikeitimas buvo įvertintas ir tėkmės citometrijos metodu (29 pav.).



29 pav. Tėkmės citometrijos būdu nustatytas annexinV-FLUOS nusidažiusių ląstelių kiekis kamienuose su Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijomis.

Tėkmės citometrijos rezultatai parodė 5–10 % didesnę apoptozinių ląstelių kiekį, nei buvo nustatytas mikroskopuojant. Toks neatitikimas galėjo atsirasti dėl skirtingo dviejų metodų jautrumo. Šio eksperimento metu buvo gauta būtent apie 10 % sudaranti negyvų ląstelių frakcija, kurios fluorescencija šiek tiek skyrėsi nuo apoptozinėmis laikomų ląstelių fluorescencijos. Remiantis literatūros duomenimis ši ląstelių dalis buvo priskirta prie ankstyvąją apoptozę patyrusių ląstelių. Nepaisant šių skirtumų, apoptozinių ląstelių kiekio populiacijoje variacijos išlieka tos pačios, tėkmės citometrija yra tinkamas metodas ankstyvosios ląstelių žūties žymenų nustatymui. Didžiausias aneksinu nusidažiusių ląstelių kiekis nustatytas *Ras2^{Val19}*, *ΔPDE2* ir *JT21569* kamienuose, o didžiausiu nekrozinių ląstelių skaičiumi pasižymėjo *ΔRas1*, *ΔRas2*, *ΔRas1/2* ir *JT21570* kamienai. Papildomos *PDE2* geno kopijos įvedimas lėmė mažesnę apoptozinių ląstelių kiekį *JT21570* kamiene, o *PDE1* genas šia savybe nepasižymėjo (*JT21569*).



30 pav. Rūgštinio streso sukelta apoptozė mielių ląstelėse inkubavus jas pH 2,1 tirpale 4 val. ir 6 val.

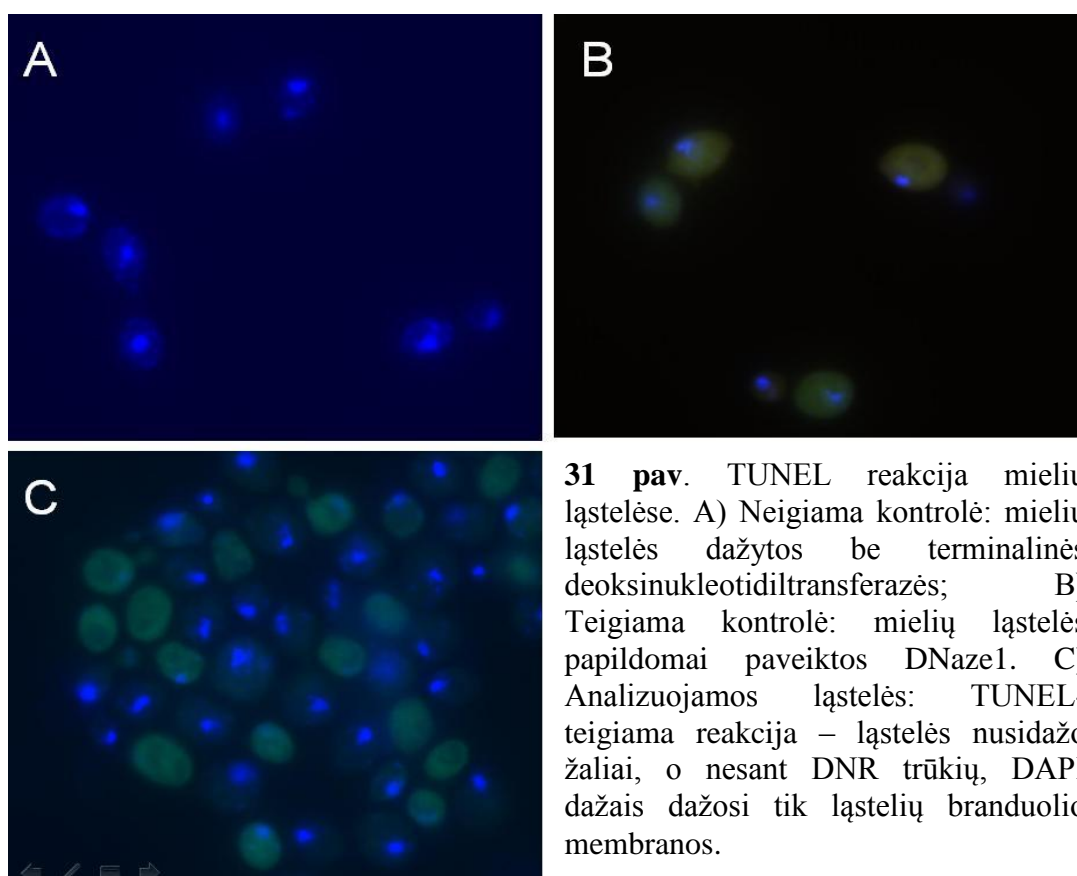
Rūgštinio streso tyrimai parodė, kad mielių ląstelių inkubavimas kontroliniame pH 5,4 tirpale 4 val. apoptozę indukavo mažiau nei 1 %, o inkubavimas 6 val. – mažiau nei 5 % tirtų kamienų ląstelių. Priešingai, inkubacija pH 2,1 tirpale jau po 4 val. ankstyvąją apoptozę sukėlė $21,23 \pm 1,26$ % SP1 ląstelių, o po 6h – $41,12 \pm 2,56$ % (30 pav.). Patikimai panašus aneksinu nusidažiusių ląstelių kiekis nustatytas $\Delta Ras1$, $\Delta PDE1$ ir visuose transformantuose. Itin dideliu apoptozinių ląstelių kiekį stebėjome $Ras2^{Val19}$ ir $\Delta PDE2$ kamienuose.

Jau po 4 val. rūgštinio streso sąlygomis (pH 2,1) fosfatidilserino lokalizacijos pakitimai nustatyti abiejuose kamienuose atitinkamai – $45,15 \pm 1,23$ % ir $52,12 \pm 1,58$ % ląstelių. Po 6 val. inkubacijos pH 2,1 tirpale abiejuose kamienuose apoptozinių ląstelių kiekis išaugo beveik dvigubai, t.y. viršijo 98 procentus. Statistiškai patikimas ($p < 0,05$), palyginus su SP1, aneksinu nusidažiusių ląstelių kiekis nustatytas ir JT21569 kamiene. JT21570 kamiene apoptozinių ląstelių kiekis buvo patikimai mažesnis nei SP1 kamiene. Toks pat rezultatas gautas ir $\Delta Ras2$ ir $\Delta Ras1/2$ kamienų atveju. Paminėtina tai,

kad ankstyvą apoptozę patyrusių ląstelių kiekis $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$, $\Delta PDE1/2$, $JT21570$ kamienuose nedidėjo ilgėjant inkubacijos rūgštinio streso sąlygomis laikui. Kitais atvejais buvo stebimas nuo inkubacijos laiko priklausomas ženklus apoptozinių ląstelių kiekio padidėjimas.

3.3.3. DNR fragmentavimo įvertinimas.

DNR trūkių atsiradimas taip pat yra ankstyvosios apoptozės žymuo ir buvo nustatomas atliekant TUNEL reakciją (31 pav.).



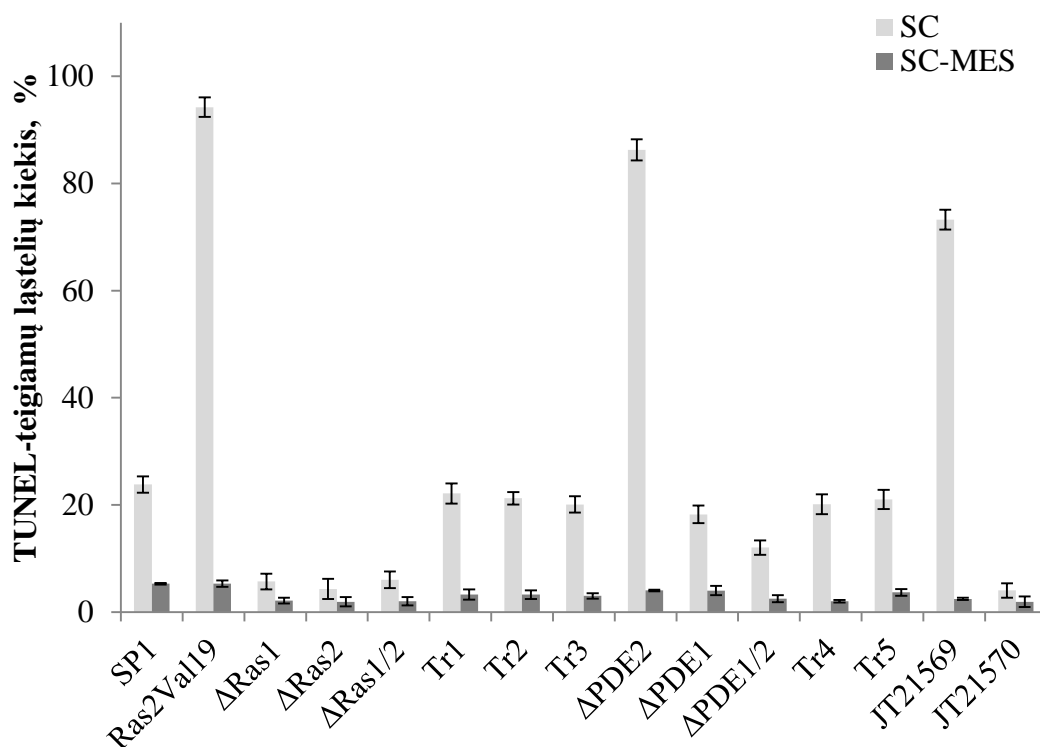
Apoptozinių DNR trūkių metu atsiranda laisvi 3'OH galai, kurie paveikus terminaline deoksinukleotidiltransferaze gali būti pažymimi modifikuotais nukleotidais. TUNEL teigiamas fenotipinis požymis – žaliai nusidažiusios ląstelės, rodo, kad jose atsirado DNR trūkių.

Turtingose YPD ir YPD-MES terpėse DNR trūkiai buvo nustatyti mažiau nei 1% ląstelių.

Teigiamai aneksuV-FITC besidažančios kamienų ląstelės $Ras2^{Val19}$, $\Delta PDE2$ ir $JT21569$ taip pat rodė ir TUNEL teigiamą fenotipą, atitinkamai

94,25 ± 1,84 %, 86,26 ± 1,97 % ir 73,25 ± 1,84 %, taip demonstruodami DNR trūkių atsiradimą po 78 val. augimo SC terpėje (30 pav.). Beje, *RAS* genų delecijas turinčiuose kamienuose teigiama TUNEL reakcija buvo nustatyta mažiau nei 6 % ląstelių ($\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$). DNR trūkiai taip pat buvo identifikuoti 23,8 ± 1,54 % *SP1* ir 18,24 ± 1,64 % $\Delta PDE1$ kamienų ląstelių. *JT21570* kamienne DNR trūkiai buvo nustatyti 4,02 ± 1,34 % ląstelių. Transformantuose ląstelių su DNR pažaidomis kiekis nežymiai svyravo *SP1* kamieno patikimumo ribose.

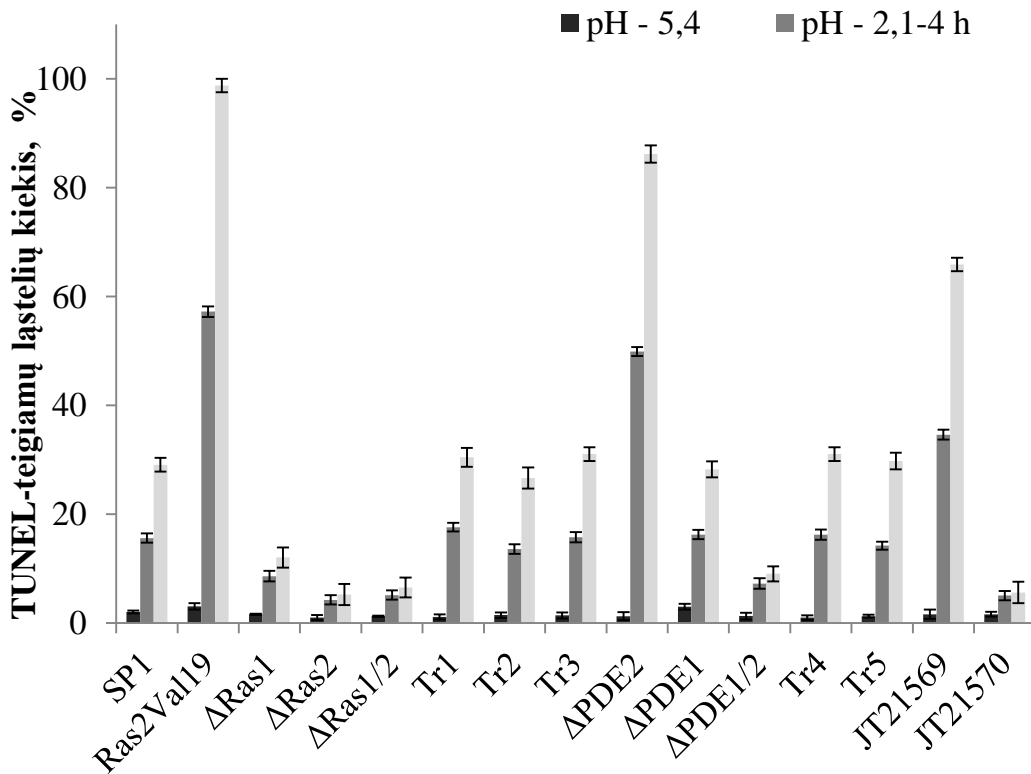
Pastovaus pH palaikymas SC-MES terpėje sąlygojo ženklų apoptozinių ląstelių kiekio populiacijoje sumažėjimą (32 pav.). DNR trūkiai identifikuoti mažiau nei 6 % ląstelių.



32 pav. Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijas turinčių kamienų su fragmentuotu chromatinu kiekis kamienus auginus 78 valandas SC ir SC-MES terpėse.

Rūgštinio streso įtakos eksperimentų rezultatai DNR trūkius turinčių ląstelių atsiradimui pateikiami 33 pav. Inkubacija pH 5.4 tirpale nė vieno kamieno atveju neindukavo patikimo DNR trūkius turinčių ląstelių kiekio

atsiradimo. TUNEL-teigiamų fenotipų kiekis neviršijo 3 %. Tačiau jau po 4 val. SP1 kamieno kultivavimo rūgštinio šoko sąlygomis $15,59 \pm 0,84$ % ląstelių buvo nustatyti DNR trūkiai. Po 6 val. inkubacijos šis kiekis padidėjo iki $29,07 \pm 1,26$ %. Panašus DNR fragmentaciją patyrusių ląstelių kiekis identifiкуotas ir visuose transformantų kamienuose ir $\Delta PDE1$ kamienne.



33 pav. Ląstelių su DNR trūkiais kiekis po rūgštinio streso indukcijos mielių kamienuose su Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijomis. Tiriamųjų kamienų ląstelės inkubuotos 6 val. kontroliniame pH 5,4 ir 4 ir 6 val. pH 2,1 tirpaluose.

Statistiškai patikimas TUNEL teigiamų ląstelių kiekio padidėjimas nustatytas $Ras2^{Val19}$ ir $PDE2$ kamienuose, ($p < 0,05$). 4 val. rūgštinio streso indukcijos sąlygojo DNR trūkių atsiradimą daugiau nei 50 % ląstelių, o po 6 val. TUNEL-teigiamų ląstelių kiekis populiacijoje viršijo 85 %.

Papildomų fosfodiesterazių genų kopijų įvedimas į PKA mutaciją turinčius kamienus sąlygojo skirtingus rezultatus:

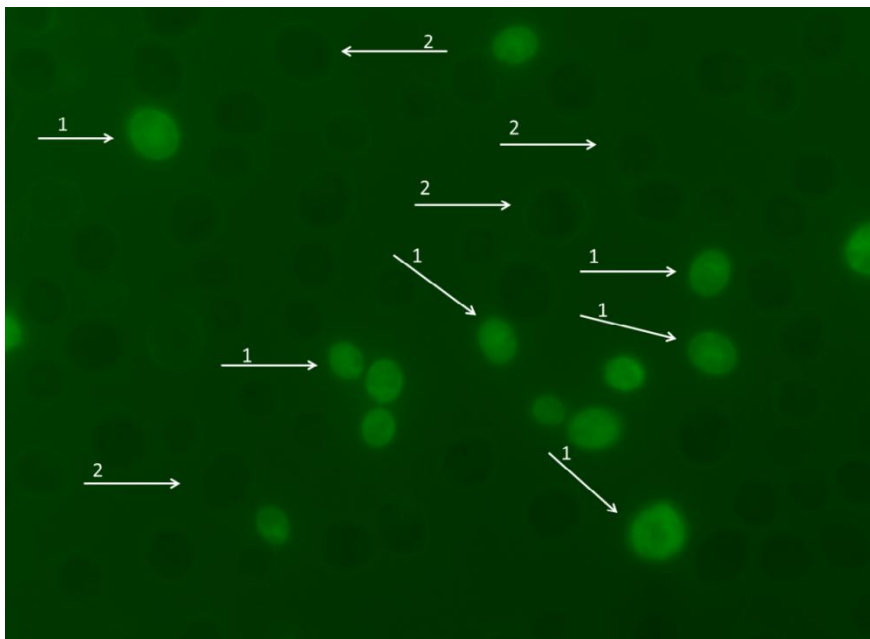
- *PDE1* geno įvedimas po inkubacijos rūgštinio streso sąlygomis 4 ir 6 val. sukėlė ankstyvąją apoptozę atitinkamai $34,59 \pm 0,9$ % ir $65,89 \pm 1,26$ % ląstelių,

- *PDE2* geno įvedimas sąlygojo patikimą, palyginus su SP1, apoptozinių ląstelių kiekio sumažėjimą iki $5,01 \pm 0,85$ % po 4 val. ir $5,59 \pm 1,96$ % po 6 valandų inkubacijos pH 2,1 tirpale.

RAS genų delecija ir Ha-ras geno įvedimas sąlygojo ženkliai mažesnę ląstelių su DNR trūkiais kiekį nei SP1 kamiene. Net ir po 6 valandų inkubavimo rūgštinio streso sąlygomis apoptozinių ląstelių kiekis populiacijose neviršijo 14 %. Patikimai mažiau apoptozinių ląstelių, palyginus su laukiniu kamienu ($p < 0,05$), nustatyta ir $\Delta PDE1/2$ kamiene.

3.3.4. Aktyvių kaspazių identifikavimas.

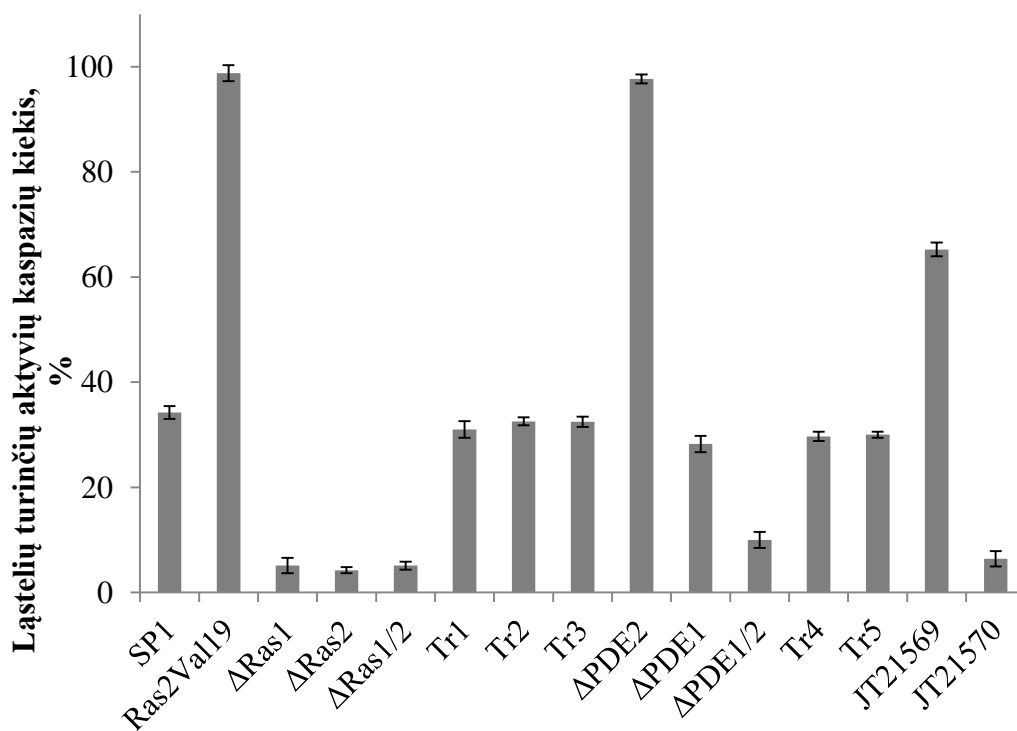
CaspACETM FITC-VAD-FMK *in situ* žymuo – tai fluoroizotiocianatas (FITC) konjuguotas su kaspazių inhibitoriumi VAD-FMK, kuris geba lengvai patekti į ląstelės vidų. Tokia struktūra patekusi į ląstelę susijungia su aktyviomis kaspazėmis ir taip tarnauja apoptozės žymeniu, kuris gali būti identifikuojamas nustatant fluorescencijos lygį (34 pav.)



34 pav. Aktyvių kaspazių identifikavimas mielių kamienų su Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijomis ląstelėse. 1. Žaliai nusidažo aktyvias kaspazes turinčios ląstelės. 2. Ląstelės, neturinčios aktyvių kaspazių, nesidažo.

YPD ir YPD-MES terpėse ląstelių, turinčių aktyvias kaspazes, buvo < 1 %. Tiek pat apoptozinių ląstelių nusatyta ir kontrolinėse eksponentinės augimo stadijos ląstelėse SC ir SC-MES terpėse.

Rezultatai parodė, kad po 78 valandų mielių kamienų kultivavimo SC terpėje $34,26 \pm 1,22$ % SP1 kamieno ląstelių buvo identifikuotos aktyvios kaspazės. Panašus ląstelių su aktyviomis kaspazėmis kiekis buvo nustatytas ir visuose transformantuose ir *PDE1* geno mutaciją turinčiame kamiene (35 pav.). Mažiau nei 10 nuošimčių aktyvias kaspazes turi $\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$ ir *JT21570* kamienų ląstelių. $98,78 \pm 1,53$ % *Ras2^{Val19}* kamieno ląstelių identifikuotos aktyvios kaspazės. Panašus kiekis nustatytas ir $\Delta PDE2$ kamiene – $97,69 \pm 0,87$ %. Tai statistiškai patikimai didesnis kiekis, palyginus su SP1 kamienu ($p < 0,05$). Taip pat statistiškai patikimai daugiau ankstyvąją apoptozę patyrusių ląstelių nustatyta ir *JT21569* kamiene ($p < 0,05$) – $65,26 \pm 1,29$ %.



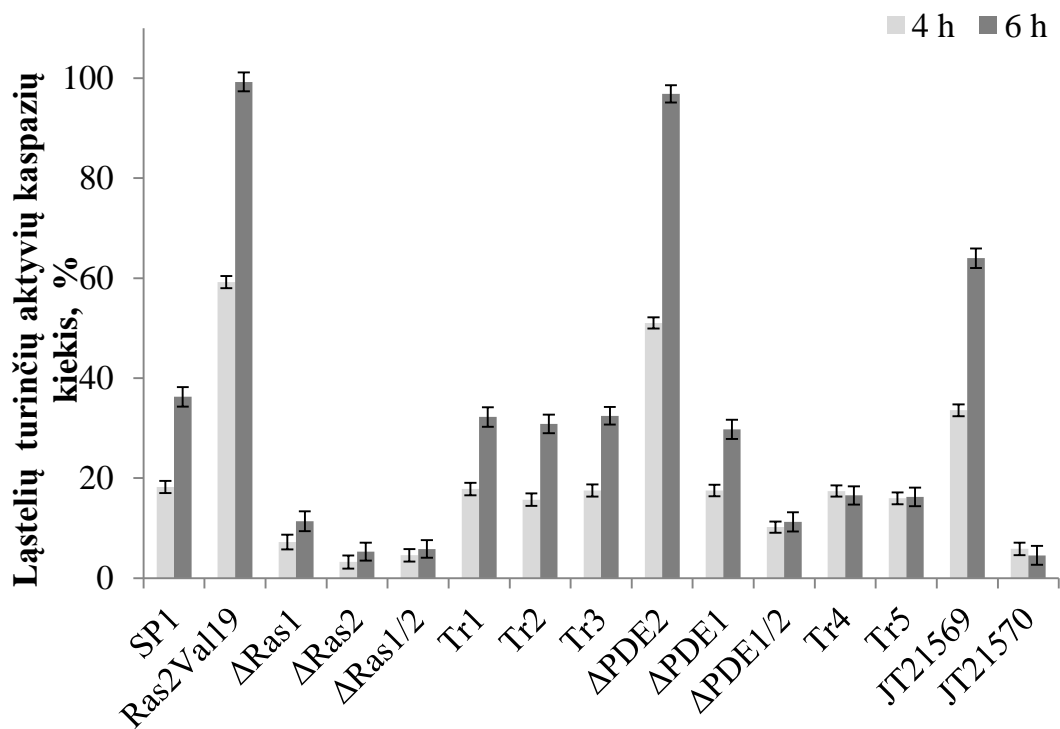
35 pav. Ląstelių su aktyviomis kaspazėmis kiekis mielių kamienuose su Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijomis po 78 val augimo SC terpėje.

Būtent *Ras2* geno deleciją turinčiame kamiene nustatyta tik $4,23 \pm 0,58$ % apoptozinių ląstelių, turinčių aktyvias kaspazes. Panašus ankstyvąją

apoptozę patyrusių ląstelių kiekis aptiktas ir *Ras1* geno deleciją turinčiame kamiene $5,15 \pm 1,47$ %, ir $\Delta Ras1/2$ kamiene, kur mielių *RAS2* genas yra pakeistas Ha-ras ($5,12 \pm 0,75$ %). Nežymiai daugiau ląstelių su aktyviomis kaspazėmis identifikuota $\Delta PDE1/2$ kamiene – $10,02 \pm 1,51$ % ir *JT21570* – $6,42 \pm 1,47$ %.

Pastovaus pH palaikymas mitybinėje terpėje ženkliai mažino apoptozinių fenotipų atsiradimą mielių ląstelėse. Po 78 val. augimo SC-MES terpėje mažiau nei 5 % ląstelių nustatytos aktyvios kaspazės.

Rūštinio šoko indukcija parodė, kad jau po 4 val. inkubacijos pH 2,1 tirpale daugiau nei 50 % *Ras2^{Val19}* ir $\Delta PDE2$ kamienu ląstelių buvo su ankstyvosios apoptozės žymenimis (36 pav.), kai tuo tarpu pH 5,4 tirpale po 4 val. inkubacijos apoptozinių ląstelių kiekis buvo mažesnis nei 1 %.



36 pav. Ląstelių su aktyviomis kaspazėmis kiekis mielių kamienuose su Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijomis jas inkubavus 4 ir 6 val. pH 2,1 tirpale.

Aktyvios kaspazės po 4 val. rūgštinio streso sąlygomis nustatytos daugiau nei 33 % *JT21569* kamienu ląstelių, o laukinio kamienu SP1 atveju apoptozė nustatyta $18,23 \pm 1,21$ % ląstelių. Panašus apoptozinių ląstelių kiekis

nustatytas ir visuose transformantuose ir $\Delta PDE1$ kamiene. Mažiau aktyvias kaspazes turinčių ląstelių identifikuota $\Delta PDE1/2$ kamiene, tačiau šis skirtumas, palyginus su SP1, nėra statistiškai patikimas ($p > 0,05$). Rūgštinis šokas aktyvavo kaspazes mažiau nei 9 % $\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$ ir $JT21570$ kamienų ląstelių. Net ir po 6 valandų kultūrų inkubavimo rūgštinio streso sąlygomis apoptozinių ląstelių kiekis išliko labai panašus ir neviršijo 13 %.

Jautrių rūgštiniam šokui kamienų atveju, inkubacijos laiko ilginimas didino ir aktyvias kaspazes turinčių ląstelių kiekį: $Ras2^{Val19}$, $\Delta PDE2$ kamienuose po 6h inkubacijos pH 2,1 tirpale apoptozinių ląstelių kiekis išaugo apie 40 %, $JT21569$ – beveik 30 %. Palyginus apoptozinių ląstelių kiekį po 4 val. ir 6 val. inkubacijos, statistiškai patikimai daugiau apoptozinių ląstelių nustatyta SP1 ir $\Delta PDE1$ kamienuose ir $Tr1$, $Tr2$, $Tr3$ transformantuose. $Tr4$ ir $Tr5$ transformantuose aktyvias kaspazes turinčių ląstelių kiekis nepriklausė nuo inkubacijos pH 2,1 tirpale laiko. Atspariuose rūgštiniam šokui kamienuose inkubacijos laiko ilginimas neženkiai didino apoptozinių ląstelių procentą populiacijoje ($p > 0,05$), o $JT21570$ aktyvias kaspazes turinčių ląstelių kiekis net šiek tiek sumažėjo.

Ląsteles inkubavus kontroliniame pH 5,4 tirpale, nei po 4, nei po 6 val. nebuvo stebima statistiškai patikimos kaspazių aktyvacijos mielių ląstelėse. Visais atvejais, net ir po 6 val. inkubacijos, ankstyvąją apoptozę patiriančių ląstelių kiekis buvo mažesnis nei 5 %.

Ląstelių žūties tipo įvertinimo eksperimentai įrodo, kad būtent Ras/PKA signalinio kelio komponentai reguliuoja senėjimo ir žūties mechanizmus mielių ląstelėse natūraliomis ir rūgštinio streso sąlygomis. Išsamus tokių procesų reguliacijos suvokimas ir galimybė juos kontroliuoti leistų panaudoti mielių kamienus daugelyje žmogaus genetikos mokslinių tyrimų sričių ir maisto pramonės technologiniuose procesuose.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Mikroorganizmai ir aplinka sudaro vientisą, pastoviai sąveikaujančią ir dėl to besikeičiančią sistemą. Todėl vienu iš pagrindinių faktorių apsprendžiančių mikroorganizmų, tuo pačiu ir mielių, ląstelių augimą ir išgyvenimą yra nuolat besikeičianti aplinka. Iš vienos pusės mikroorganizmai reaguoja į aplinkoje – terpėje esančius mitybinius šaltinius, kita vertus, jų augimą įtakoja ir į aplinką sekretuojami pačių ląstelių metabolitai.

Viena iš molekulinė sistemų, leidžiančių mielių ląstelėms greitai reaguoti į aplinką, yra Ras/PKA signalinis kelias. Jis įgalina ląstelę operatyviai generuoti atsaką tiek į maisto medžiagų buvimą, tiek ir į atsirandančius aplinkoje stresinius veiksnius. Atsakas į stresą gali būti pats įvairiausias – nuo ląstelės ciklo sustabdymo iki jos žūties. Šio darbo metu buvo siekiama išsiaiškinti, kaip Ras/PKA signalinio kelio komponentai įtakoja atsaką į palaipsniui natūraliai augimo metu mažėjantį aplinkos pH ir rūgštinį stresą ir kaip tai atsiliepia ląstelių gyvybingumui ir žūties programos pasirinkimui.

Mūsų sukurtos eksperimentinės sąlygos leido analizuoti Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtaką mielių kamienų metabolizmo efektyvumui, ląstelių gyvybingumui ir jų žūties būdo pasirinkimui natūralaus laipsniško terpės pH mažėjimo atveju ir rūgštinio streso metu.

Visų mielių kamienų augimo metu stebimas didesnis ar mažesnis mitybinės terpės rūgštėjimas. Analizuojant mielių kamienų augimą YPD ir SC terpėse buvo įrodyta, kad pH patikimai mažėja tik jiems augant sintetinėje SC terpėje. YPD terpėje pH kitimas buvo nedidelis. Į jos sudėtį įeinantis peptonas gali pasižymėti buferinėmis savybėmis. Šioje terpėje buvo pasiekiamas ir didelis ląstelių tankis, kuris nesiskyrė palyginus atskirus kamienus.

Ras/PKA signalinio kelio komponentų mutacijas turinčius kamienus kultivuojant SC terpėje išryškėjo ženklūs jų augimo ir terpės rūgštinimo skirtumai. Tirtų kamienų augimo ir pH kitimo rezultatai išryškino palaipsnio pH kitimo tiesioginę koreliaciją su kultūrų augimo greičiu, t.y. didžiausią OT pasiekiantys ir greičiausiai augantys kamienai pasižymėjo ir didžiausiu terpės

rūgštinimo efektu. Pagal augimo greitį ir mitybinės terpės pH mažėjimą, kamienus galima suskirstyti į dvi diskretines grupes:

1. Pirmosios kamienų grupės augimas ir jo metu pasiekiamas žemiausias pH nesiskyrė nuo SP1 kamieno. Šiai grupei priklauso $\Delta Ras1$, $Ras2^{Val19}$, $\Delta PDE2$, $\Delta PDE1/2$, $JT21569$ kamienai.

2. Antrąją grupę sudarė kamienai, kurie pasiekė statistiškai patikimai didesnę OT, palyginus su SP1 kamieno OT, o pasiekiamas žemiausias SC terpės pH buvo patikimai mažesnis. Šiai grupei priskiriami $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$, $\Delta PDE1$, $JT21570$ kamienai.

Transformantų augimas ir gebėjimas rūgštinti mitybinę terpę, išskyrus $Tr2$, nesiskyrė nuo SP1. $Tr2$ transformanto atveju, ląstelių tankis buvo tarpinis tarp tėvinio ir laukinio kamienų, o pasiekiamas žemiausias pH statistiškai patikimai nesiskyrė nuo $\Delta Ras2$ kamieno. Galimas variantas, kad vidutinį kopijų skaičių turinčios plazmidės nepakanka pilnai kompensuoti $RAS2$ geno funkcijos netekimo, arba dalį kamieno ląstelių populiacijos gali sudaryti plazmidės netekusios, nesidalijančios, tačiau išlaikiusios gyvybingumą ląstelės.

Ląstelių augimo greitis ir pasiekiamas biomasės kiekis atspindi ląstelių replikacinį potencialą, o metabolizmo efektyvumą dalinai parodo gebėjimas rūgštinti mitybinę terpę. Ląstelių gebėjimą augti ir išgyventi tam tikroje mitybinėje terpėje apsprendžia du pagrindiniai veiksniai – gliukozės koncentracija ir terpės pH (Burtner ir kt., 2009). Mielių kamienai paprastai yra auginami mitybinėje terpėje, turinčioje 2 % gliukozės. Žinoma, kad šios koncentracijos sumažinimas iki 0,5 % ar 0.05 % pratęsia ląstelių replikacinį amžių (Kaeberlein ir kt., 2005a; Lin ir kt., 2000; Kaeberlein ir kt., 2007) ir taip yra pasiekiamas didesnis ląstelių tankis. Replikacinį mielių amžių ilgina mutacijos, mažinančios PKA ir TOR signalinių kelių, reaguojančių į aplinkoje esančias maisto medžiagas, aktyvumą (Kaeberlein ir kt., 2005 b; 2005 c; Lin, Guarente, 2006). Yra žinoma, kad mutacijos šiuose signaliniuose keliuose lemia ląstelių amžiaus ilgėjimą nebepriklausomai nuo maisto medžiagų buvimo aplinkoje. Net ir esant skurdžiai mitybinei aplinkai ląstelės intensyviai auga ir dalijasi. (Steinkraus ir kt., 2008).

Antrasis veiksnys, lemiantis ląstelių augimą ir išgyvenimą, yra terpės pH. Mielėse ir daugelyje kitų grybų, aplinkos rūgštėjimas aktyvina Ras/PKA signalinį kelią. Mitybinė terpė pagrindinai rūgštėja dėl acto rūgšties kaupimosi joje (Ludovico ir kt., 2001). Be acetato terpėje kaupiasi ir kitos organinės rūgštys – malatas, piruvatas, oksalatas ir k.t., kurios rūgštinėje aplinkoje stiprina toksinį acto rūgšties poveikį ląstelėms mažindamos aplinkos pH (Burtner ir kt., 2009). Acto rūgšties sukeltas terpės rūgštėjimas veda prie viduląstelinio rūgštėjimo (Mollapour, ir kt., 2006), o tai sukelia Ras/PKA signalinį atsaką.

Mūsų eksperimentų metu nustatyta, kad pakitusio Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo kamienų augimo greitis ir sukaupiamas biomasės kiekis terpėje su pastoviu pH (SC-MES) buvo kelis kartus didesnis nei toje pačioje terpėje tik kintančio pH sąlygomis (SC). Tokie rezultatai įrodo, kad Ras/PKA signalinio kelio komponentai vaidina svarbų vaidmenį, lemiantį ląstelių adaptaciją natūralaus aplinkos pH mažėjimo metu. Tiek kelio padidinto aktyvinimo, tiek ir aktyvumo sumažėjimo atveju, sutrikdoma adekvati ląstelės reakcija į pasikeitusią aplinką, kas sąlygoja ženklų ląstelių amžiaus trumpėjimą arba atvirkščiai.

Mūsų tyrimo duomenys buvo patvirtinti ir Burtner su bendraautoriais, kurie nustatė, kad aplinkos pH taip pat gali turėti įtakos replikaciniam ląstelių potencialui Ras/PKA signalinio kelio mutantuose (2009).

Mutacijų sąlygoti Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo pakitimai ženkliai įtakojo ir mielių ląstelių gyvybingumą. Mūsų tyrimo metu buvo įrodyta, kad palaipsniui rūgštėjančioje aplinkoje *RAS* genai pasižymi skirtinga funkcija ląstelių gyvybingumo atžvilgiu. *RAS2* geno delecija sukėlė žymiai didesnę gyvybingumo padidėjimą, augant mielėms SC terpėje kintančio pH sąlygomis, palyginus su SP1 kamieniu, nei *RAS1* delecija. Pasiekiamas žemiausiais terpės pH yra 2,28 Δ *Ras2* kamieno atveju, o Δ *Ras1* kamienas terpės pH mažino iki 3,35. Taigi natūraliai rūgštėjančioje aplinkoje pagrindinio neigiamo mielių ląstelių gyvybingumo reguliatoriaus vaidmuo tenka *RAS2* genui, o *RAS1* funkcija šiame procese lieka neatskleista.

Jau nuo 1994 metų yra diskutuojama apie skirtingą *RAS1* ir *RAS2* genų vaidmenį ląstelės ilgaamžiškumo kontekste, ir prieita išvados, kad pagrindinis adenilatciklazę kontroliuojantis genas yra *RAS2*, o tuo tarpu *RAS1* atlieka pagalbinę funkciją (Sun ir kt., 1994). Mielų *RAS* genai, pagrindiniai adenilatciklazės reguliatoriai, pasižymi > 70 % bendru sekos panašumu ir net 90 % identiškumu N terminaliniame gale. Įrodyta, kad abiejų genų netekimas sukelia ląstelės ciklo stabdymą G_1 stadijoje ir yra letalus (Toda ir kt., 1985).

Jei Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo sumažinimas ženkliai didina mielų ląstelių gyvybingumą, tai jo padidintas aktyvinimas sukelia patikimą gyvybingumo sumažėjimą palyginus su laukiniu kamieniu. Jau po 46 valandų augimo SC terpėje, ankstyvojoje stacionariojoje stadijoje, 32,37 % *Ras2^{Val19}* kamieno ląstelių buvo identifikuojamos, kaip žuvusios. Senai nustatyta, kad *Ras2^{Val19}* yra nejautrios pakitimams jų mitybinėje aplinkoje arba nesugeba generuoti tinkamo fiziologinio atsako į stresines sąlygas – diploidinės ląstelės nesporuliuoja bado sąlygomis, haploidinės ląstelės nekaupia maisto medžiagų perėjusios į stacionariąją stadiją (Toda ir kt., 1987).

Mūsų eksperimentai parodė, kad rūgštėjančioje aplinkoje *Ras2^{Val19}* ląstelių gyvybingumas patikimai mažėja jau ankstyvojoje stacionariojoje stadijoje, kai kitų kamienų gyvybingumas šiame augimo etape viršija 80 %. Panašūs rezultatai gauti ir analizuojant $\Delta PDE2$ kamieno gyvybingumą. Po 46 valandų augimo SC terpėje gyvos išliko tik $63,80 \pm 0,816$ % ląstelių. Abu šie kamieniai pagal fenotipines charakteristikas priskiriami padidėjusio Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo kamienams. Abiejuose kamieniuose nustatytas padidėjęs cAMP lygis palyginus su laukinio tipo kamienais (Hlavata ir kt., 2003, Thevelein ir kt., 1999). Įrodyta, kad dvigubame mutantiniame kamienne *Ras2^{Val19}pde1 Δ pde2 Δ* cAMP lygis keliasdešimt kartų viršija normalų (Nikawa ir kt., 1987).

Vėlyvojoje stacionariojoje stadijoje, po 78 valandų augimo SC terpėje, *PDE2* kamieno gyvybingumas statistiškai nesiskyrė nuo SP1, o *Ras2^{Val19}* kamieno atveju buvo stebimas ženklus gyvybingumo sumažėjimas. Tai rodo, kad konstitutyvus Ras/PKA signalinio kelio aktyvinimas (*Ras^{Val19}*) sukelia

ryškesnius ląstelių fiziologinius pokyčius, o *PDE2* geno netekimas, šiomis aplinkos sąlygomis, gali būti dalinai kompensuotas *PDE1* geno (Park ir kt., 2005).

Natūraliai rūgštėjančioje aplinkoje dviejų mielių fosfodiesterazių inaktyvinimas turėjo visiškai priešingą poveikį ląstelių gyvybingumui: *Pde1p* inaktyvinimas lėmė statistiškai patikimą ląstelių gyvybingumo padidėjimą, kai *Pde2p* inaktyvinimas sąlygojo patikimą sumažėjimą, palyginus su *SP1* kamieniu (abiem atvejais $p < 0,05$). $\Delta PDE1/2$ kamienne ląstelių gyvybingumas buvo statistiškai panašus į $\Delta PDE1$ kamieno. Tai rodo, kad rūgštinėje aplinkoje pagrindinio neigiamo ląstelių gyvybingumo reguliatoriaus vaidmuo tenka *Pde1p* fosfodiesterazei, o jos inaktyvacijos sukiamas efektas išlieka ir $\Delta PDE1/2$ kamienne. Mielų ląstelėms augant laipsniško rūgštėjimo sąlygomis dviguba abiejų fosfodiesterazių genų delecija sukėlė ryškų ląstelių gyvybingumo padidėjimą palyginus su $\Delta PDE2$ kamieniu.

Žinoma, kad *Pde2p* kontroliuoja bazinį cAMP kiekį ląstelėje stacionariojoje stadijoje (Park ir kt., 2005) ir saugo ją nuo ekstraląstelinio cAMP. Todėl šio geno inaktyvinimas lemia ląstelių homeostazinio balanso sutrikimą, kas veda prie ląstelių gyvybingumo mažėjimo. *Pde1p* reikalingas didelių cAMP koncentracijų degradavimui (Wilson ir kt., 1993). Vėlyvosios stacionariosios stadijos metu, tiek rūgštinio streso, tiek ir laipsniško rūgštėjimo, sąlygomis, ženkliai išauga cAMP sintezė. Todėl tokioje aplinkoje pagrindinis cAMP skaldytojo vaidmuo tenka būtent *Pde1p*. Jo inaktyvinimas rūgštinėmis sąlygomis veda prie ląstelių gyvybingumo padidėjimo.

Tėkmės citometrijos būdu buvo patvirtinti ląstelių gyvybingumo rezultatai. Visais atvejais buvo nustatyta maždaug 10–20 % daugiau negyvų ląstelių nei mikroskopuojant. Tėmės citometrijos būdu bet koks ląstelių nusidažymas (dalinis, rausva, gelsva, rusva spalva) yra registruojamas kaip teigiamas signalas. Mikroskopuojant negyvos yra tik tos ląstelės, kurios yra pilnai nusidažiusios propidžio jodidu ir švyti raudonai. Taip pat į bendrus skaičiavimus nėra įtraukiami nusidažę ląstelių fragmentai ar artefaktai, atsirandantys preparatų paruošimo metu, ir nevertinama natūrali ląstelių

autofluorescencija, o tĕkmĕs citometru visa tai skaiĉiuojama kaip teigiamas signalas.

Ląstelų gebėjimas formuoti kolonijas turĕjo parodyti, kiek gyvų ląstelų geba replikuotis ir formuoti kolonijas, o taip pat, kiek procentų iš negyvos laikytų ląstelų sugeba pratĕsti savo gyvavimą perkĕlus jas į geresnes sąlygas. Kaip mikroskopijos ir tĕkmĕs citometrijos metodai, taip ir išsĕjimai neparodĕ jokio statistinio pokyĉio, palyginus ląstelų augimą YPD ir YPD-MES terpĕse. Palankiose sąlygose virš 90% ląstelų gebĕjo formuoti kolonijas.

Po 78 val. augimo SC mitybinĕje terpĕje kolonijų formavimo eksperimento rezultatai parodĕ, kad visuose kamienuose kolonijas formuojanĉių ląstelų dalis buvo mažesnĕ nei mikroskopijos metu nustatytas gyvų ląstelų kiekis. Tokie rezultatai taip pat gali bŭti susiję su skirtingu metodų jautrumu, taip pat įmanoma, kad dalis gyvos laikomų ląstelų rūgštinio pH aplinkoje visgi praranda replikacinę potencialą ir net perkĕlus jas į palankias sąlygas nebesugeba formuoti kolonijų. Kaip ir ankstesni eksperimentai, taip ir gebėjimo formuoti kolonijas patikrinimas parodĕ, kad ląsteles auginus pastovaus pH sąlygomis (SC-MES) jų gyvybingumas, o kartu ir kolonijų formavimo gebėjimai, Źenkliai išauga. *Tr2* transformante nustatytas patikimas ląstelų gyvybingumo skirtumas, palyginus mikroskopijos ir kolonijų formavimo testo rezultatus. Neatmestina galimybĕ, kad šiame kamiene gali egzistuoti dalis ląstelų, kurios yra pametusios plazmidės, nebesidauginanĉios, taĉiau išlikusios gyvos. Tokios ląstelĕs perkeltos iš minimalių sąlygų į turtingą mitybinę terpę geba daugintis ir formuoti kolonijas.

Beveik visais atvejais labiausiai terpĕs pH mažinantys kamienai pasiŹymĕjo ir didžiausiu ląstelų gyvybingumu. Tai rodo, kad aukštu metabolizmo lygiu pasiŹyminĉios mielių ląstelĕs geba apsisaugoti nuo Źemo aplinkos pH poveikio, išlaikyti savo gyvybingumą ir pratĕsti amŹių. Mūsų ir kitų autorių atlikti tyrimai tyrimai parodĕ, kad pastovaus pH palaikymas mitybinĕje terpĕje Źenkliai pratĕsia ląstelų chronologinę amŹių. Kokie viduląsteliniai veiksniai lemia stacionariosios fazĕs ląstelų atsparumą besikaupiantiems metabolitams ir mažĕjanĉiam terpĕs pH? Burhans ir

Weinberger 2009 metais parodė, kad nudažius ląsteles propidžio jodidu mažiausiai 2 kartus didesnis kiekis nebuferintoje mitybinėje terpėje augančių ląstelių miršta pumpuruodamos nei nepumpuruodamos. O palaikant pastovų terpės pH skirtumo tarp žūstančių ląstelių, vis dar besidalijančių pumpuravimosi būdu ir nesidalijančių nebuvo nustatyta. Pateikti rezultatai rodo, kad acto rūgšties kaupimasis stacionariosios fazės kultūrose inhibuoja jų ląstelės ciklo stabdymą G_1 stadijoje ir yra toksiškas toms ląstelėms, kurių ciklas nebuvo sustabdomas G_1 stadijoje (Burhans, Weinberger 2009).

Būtent Ras/PKA signalinio kelio aktyvumas yra tiesiogiai susijęs su ląstelės ciklo sustabdymu, taigi ir atsparumo mechanizmu, natūralaus terpės rūgštėjimo sąlygomis. Mutacijos Ras/PKA signaliniame kelyje keičia ląstelių gebėjimą adekvačiai reaguoti ir į stresines sąlygas. Didžiausiu atsparumu stresinėms sąlygoms pasižymėjo $\Delta Ras2$ kamienas. Šio kamieno ląstelių gyvybingumas inkubavus jas pH 2,1 tirpale kelis kartus viršijo SP1 kamieno gyvybingumą ($p < 0,001$). $RAS1$ geno delecija rūgštinio streso metu turėjo kur kas mažesnę įtaką mielių ląstelių gyvybingumui. $\Delta Ras1$ kamieno ląstelių gyvybingumas neženkliai skyrėsi nuo SP1.

Įrodyta, kad būtent $RAS2$ genas yra vienas svarbiausių, streso metu veikiančių genų reguliatorių (Jazwinski, 2002). Žinoma, kad $RAS2$ genas slopina genų, savo promotoriuose turinčių STRE elementus, transkripciją ir taip stabdo streso atsaką. Konstitutyvus Ras2/cAMP kaskados aktyvinimas veda prie nereguliuojamos proliferacijos ir jautrumo įvairiems stresams (Broach, 1991). Žinoma, kad rūgštinio streso metu $RAS2$ geno delecija sukelia nuolatinę karščio šoko ir kitų stresinių sąlygų genų ekspresiją ir didina bendrą ląstelių atsparumą stresui (Estruch, 2000). Nustatyta, kad $ras2\Delta$ ląstelių atsparumas žemam pH gali būti susijęs su šių kamienų ciklo stabdymu G_1 stadijoje greičiausiai indukuojant nuo ciklinų priklausomų kinazių inhibitorių Sic1 (Zapater ir kt., 2005). Sic1 blokuoja ląstelių perėjimą į S fazę.

Mes parodėme, kad rūgštinio streso metu konstitutyvus Ras/PKA signalinio kelio aktyvinimas sukėlė patikimą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą, palyginus su SP1 kamieniu. Jautrumas rūgštiniam stresui

pasireiškė ir inaktyvinus *PDE2* geną. $\Delta PDE2$ kamieno ląstelėse nustatytas patikimai mažesnis gyvų ląstelių kiekis nei SP1. Tai patvirtina faktą, kad padidėjęs cAMP kiekis ląstelėje yra tiesiogiai susijęs su padidėjusiu PKA fosforilinimo sukeltu jautrumu stresams (Stanhill ir kt., 1999). *PDE1* ir *PDE2* fosfodiesterazės pasižymėjo skirtinga įtaka ląstelių gyvybingumui PKA mutacijas turinčiame kamiene. Papildomos *PDE1* kopijos įvedimas sąlygojo statistiškai patikimą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą, palyginus su SP1, kai papildoma *PDE2* kopija sukėlė visiškai priešingą efektą ir ląstelių gyvybingumas ženkliai išaugo. Jautrumas stresams koreliuoja su baziniu cAMP lygiu, kuris stacionariojoje stadijoje pagrindinai priklauso nuo Pde2p (Park ir kt., 2005). Papildomos *PDE2* kopijos įvedimas mažina bazinį cAMP lygį, kas sukelia atsparumą stresams ir ląstelių gyvybingumas ženkliai išauga.

Kolonijų formavimo eksperimentai parodė, kad nors bendras nustatytas kolonijas formuojančių ląstelių kiekis populiacijose buvo šiek tiek mažesnis nei mikroskopijos metu gautas gyvų ląstelių skaičius, tačiau didžiausiu gyvybingumu po rūgštinio streso pasižymėję kamienai formavo ir daugiausiai kolonijų. Tai rodo, kad atsparumas stresinėms sąlygoms tiesiogiai koreliuoja ir su ląstelių replikaciniu potencialu, tačiau nebūtinai visos gyvomis laikytos ląstelės išlaiko gebėjimą replikuoti po streso.

Ras/PKA signalinis kelias atsaką į stresą reguliuoja per bendrą streso atsako sistemą, t.y. per *Msn2* ir *Msn4* genus, ir keičia jų lokalizaciją ląstelėje (Smith ir kt., 1998). Ras/PKA signalinio kelio padidėjęs aktyvumas lemia *Msn2* ir *Msn4* transkripcijos veiksmų fosforilinimą ir neleidžia šiems elementams patekti į branduolį, kur jie turėtų jungtis prie streso atsako genų ir aktyvinti jų transkripciją, todėl ląstelėse visiškai nevyksta streso genų ekspresija, dėl to mažėja jų gyvybingumas (Gonze ir kt., 2008).

Gauti rezultatai rodo, kad Ras/PKA signalinio kelio komponentai, reguliuojantys cAMP kiekį mielių ląstelėse, pastovaus terpės rūgštėjimo sąlygomis ir rūgštinio streso metu dalyvauja ląstelių gyvybingumo ir ilgaamžiškumo reguliacijos procesuose. Tačiau galiausiai ląstelės gyvybinio ciklo, kaip ir kiekvienos biologinės sistemos, pakutinis etapas yra jos žūtis. Tad

kyla klausimas, kokį vaidmenį šio paskutinio etapo reguliacijoje atlieka Ras/PKA kelio komponentai?

Diskusijų, kad mielės irgi patiria apoptozę, nebekyla, tačiau altruistinė programuota ląstelių žūtis yra naudinga tik tada, kai mielės yra populiacijoje. Taigi išlieka klausimas, kaip pavienės ląstelės jaučia savo kaimynių buvimą aplinkoje?

Teigiama, kad laipsniškas terpės rūgštėjimas dėl acto rūgšties akumuliacijos gali būti susijęs su tarpusavio ryšio pajutimo mechanizmu (Fabrizio ir kt., 2004). Apoptozės kelio pasirinkimas reikalauja molekulinę įvykių kaskados, kurios pabaiga yra programuota ląstelės žūtis (Ludovico ir kt., 2001). Įdomu tai, kad vienoms ląstelėms mirštant senose kultūrose apoptoziniu keliu, kitos išlieka aktyvios ir padidina savo mutavimo dažnį taip ieškodamos palankių genomo pasikeitimų (Fabrizio ir kt., 2004). Nustatyta, kad žemo pH ir acetato kombinacija sukelia žūtį mielių kultūrose su apoptozei būdingais žymenimis (Ludovico ir kt., 2001). Yra žinoma, kad Ras/PKA signalinis kelias reguliuoja nuo aktino reorganizacijos priklausomą apoptozę mielėse. Būtent Ras/PKA veikia kaip tarpininkas sujungiant aplinkos signalus, tokius kaip pH kitimas, ir informacija apie maisto medžiagas ir F-aktino reorganizaciją (Ho, Bretcher, 2001, Hubbertsey, Mottillo, 2002). Taip pat padidėjęs kelio aktyvumas susijęs su ROS akumuliacija ir ląstelinio kvėpavimo efektyvumu, kas vėlgi lemia apoptozinių fenotipų formavimąsi mielių ląstelėse (Hlavata ir kt., 2003). Taigi Ras/PKA kelias įtakoja daugelį su apoptoze susijusių veiksnių.

Mūsų eksperimentais buvo įrodyta, kad Ras/PKA signalinis kelias reguliuoja mielių ląstelių gyvybingumą rūgštinėje aplinkoje (Lastauskienė, Čitavičius 2008; Lastauskienė, Čitavičius 2009). Kitame darbo etape siekėme išsiaiškinti ar rūgštinėse sąlygose mielių ląstelių žūties formų (apoptozė ar nekrozė) pasirinkimas priklauso nuo šio signalinio kelio? Siekiant gauti atsakymą analizavome ankstyvosios apoptozės žymenų pasireiškimą ląstelėse:

1. Ankstyvosios apoptozės pasireiškimą ląstelėse leidžia atskleisti branduolio morfologijos įvertinimas. Po 78 valandų tiriamųjų kamienų augimo

YPD terpėje branduolio fragmentacija buvo stebima mažiau nei 5 % ląstelių. O po 78 valandų augimo SC terpėje ląstelių su fragmentuotais branduoliais kiekis ženkliai išaugo, palyginus su YPD terpėje augančių ląstelių branduolio struktūra. Virš 60 % SP1 kamieno ląstelių buvo identifikuoti branduolio morfologijos pakitimai. Mažiausiai fragmentuotų branduolių buvo nustatyta $\Delta Ras1/2$ kamiene, $17,39 \pm 5,45$ %, o anksčiau nustatytas ląstelių gyvybingumas šioje augimo stadijoje buvo $93,37 \pm 1,109$ %. Toks neatitikimas tarp branduolio fragmentacijos ir ląstelių gyvybingumo rodo, kad ne visi matomi pakitimai yra letalūs. Taip pat šiame kamiene nustatytas didelis dvibranduolių ląstelių skaičius rodo, kad porinių branduolių atsiradimas taip pat neįtakoja ląstelių gyvybingumo.

Diskusijoje, ar poriniai branduoliai yra tiesiog simetriškas branduolio fragmentacijos padarinys (Madeo ir kt., 1997), ar endomitozės sukeltas reiškinys (Pichova ir kt., 1997), mes linkę palaikyti endomitozės teoriją, nes mikroskopijos metu nustatytas porinių branduolių dydis atitinka normalios ląstelės branduolio dydį, o fragmentacijos metu gaunami kur kas mažesnis branduolio fragmentai. Manoma, kad būtent endomitozės procesas yra susijęs su *RAS2* geno delecija (Pichova ir kt., 1997).

Statistiškai patikimai mažiau fragmentuotų branduolių ir patikimai daugiau dvibranduolių ląstelių, palyginus su SP1, nustatyta ir $\Delta Ras1/2$ kamiene. Tai rodo, kad Ha-ras sukeliama ląstelių amžiaus pratęsimo mechanizmas yra labai panašus į *RAS2* geno delecijos indukuojamą.

$\Delta PDE1$ kamiene fragmentuotų branduolių kiekis buvo patikimai mažesnis nei SP1, tačiau nustatytas patikimai didesnis kitų pakitimų skaičius. Konfokalinės mikroskopijos pagalba nustatyta, kad didžiąją dalį šių pakitimų sudarė difuziniai branduoliai.

$26,50 \pm 3,44$ % kitiems pakitimams priskiriamų branduolio morfologijų, kurių didžiąją dalį taipogi sudarė difuziniai branduoliai, nustatyta ir $\Delta Ras1$ kamiene. Tokie rezultatai dar kartą patvirtina nevienodą *RAS* genų indėlį į ląstelės gyvybingumo palaikymą rūgštinėmis sąlygomis.

2. Ankstyvosios apoptozės fenotipas buvo vertintas dažant fosfatidilseriną. Fosfatidilserino molekulės sveikose ląstelėse yra lokalizuotos ląstelės viduje, šios lokalizacijos sutrikimas rodo ankstyvosios apoptozės pradžią ir gali būti nustatomas kaip fosfatidilserino eksternalizacijos paseka (Barnett et al., 2000). Jau 1995 metais buvo įrodyta, kad fosfatidilserino lokalizacijos pasikeitimas yra nustatomas visuose tirtuose apoptozinių ląstelių tipuose, nepriklausomai nuo apoptozės induktoriaus dar prieš membranoms prarandant integralumą (Martin, Hall, 1995). Tai padaro dažymo aneksinu testą universaliu apoptozės žymenų nustatymo įrankiu.

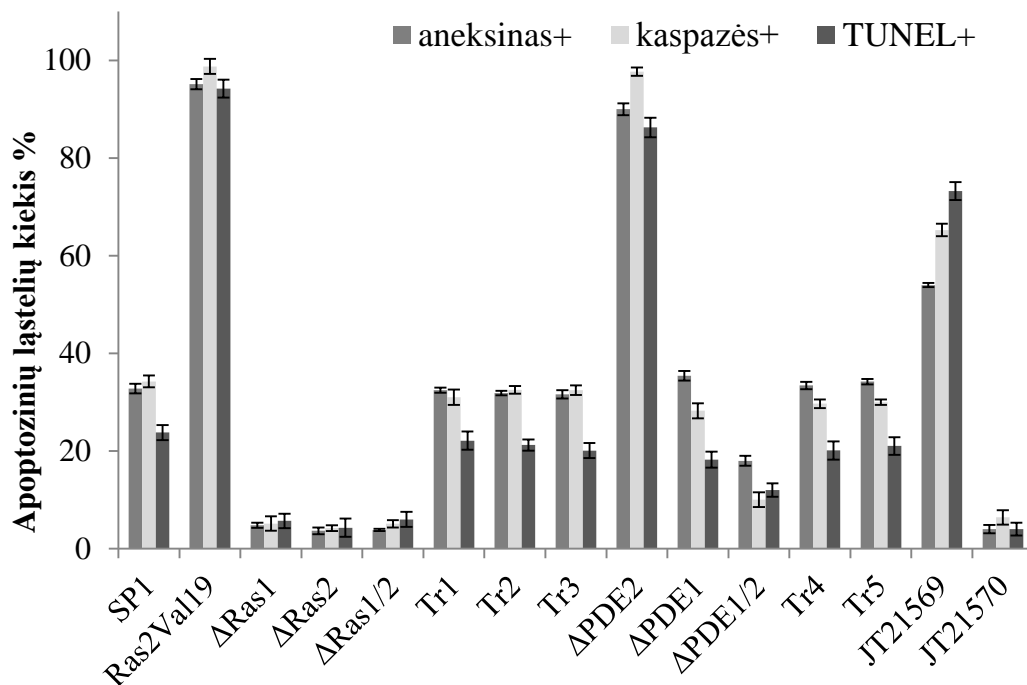
3. Kitas, neabejotinai su apoptoze susijęs procesas – DNR trūkių atsiradimas. TUNEL dažymas leidžia nespecifiškai nustatyti tiek viengrandžius, tiek ir dvigrandžius DNR trūkius (Madeo ir kt., 1997; Ribeiro ir kt., 2006)

4. Žinduolių ląstelėse identifikuojami kaspazinis aktyvumas vertinamas, kaip apoptozės žymenu. Mielių ląstelėse iki šiol identifikuota viena kaspazė – tai Mca1p, kuri siejama su proapoptozinių fenotipų atsiradimu ląstelėse joms žūstant dėl vandenilio peroksido poveikio. Šios kaspazės aktyvumo pasireiškimas ląstelių žūtyje dėl acto rūgšties poveikio ir senėjimo leidžia teigti, kad tokia žūties forma gali būti priskiriama apoptozei (Madeo ir kt., 2002). Su apoptoze susiję ir kiti, kaspazes primenantys, proteolitiniai aktyvumai mielėse (Herker ir kt., 2004). FITC-VAD-FMK leidžia identifikuoti tiek kaspazinius, tiek ir į kaspazes panašius aktyvumus mielėse, kurie tarnauja apoptozės žymenimis. Todėl šį žymenį panaudojome mūsų tyrimuose siekiant išsiaiškinti žūties mechanizmus laipsniško mitybinės aplinkos rūgštėjimo ir ląstelių senėjimo sąlygomis, taip pat ir indukavus rūgštinį stresą.

Mūsų atliktų eksperimentų rezultatai rodo, kad šių trijų apoptozės nustatymo metodų duomenys tiesiogiai koreliuoja (37 pav.). Branduolių morfologijos tyrimas parodė kur kas didesnius ląstelių su pakitusiais branduoliais kiekius populiacijose. Toks rezultatų išsiskyrimas rodo, kad branduolio fragmentacija tik parodo galimai vykstančią apoptozę mielių

ląstelėse, tačiau nenusako kiekybinės jos išraiškos, t.y. daugelį morfologinių branduolio pakitimų ląstelės geba pašalinti ir toliau sėkmingai išgyventi.

SP1 kamiene ir transformantuose sutrikusios fosfatidilserino lokalizacijos ir kaspazinius aktyvumus turinčių ląstelių kiekiai sutapo (37 pav.). Šiek tiek mažiau (apie 10 %) juose buvo identifikuota ląstelių su DNR trūkiais. Transformuotuose kamienuose apoptozinių ląstelių kiekis statistiškai nesiskyrė nuo laukinio kamieno. Statistiškai nesiskiriantis nuo SP1 aneksinu, kaspaze-teigiamai ir TUNEL nusidažiusių ląstelių kiekis nustatytas ir $\Delta PDE1$ kamiene.



37 pav. Trijų apoptozės nustatymo metodų tarpusavio koreliacija. Ankstyvąją apoptozę patyrusių ląstelių kiekis po 78 valandų augimo SC terpėje įvertintas dažant aneksinu, identifikuojant kaspazinį aktyvumą ar nustatant DNR trūkumus.

Statistiškai panašūs trijų apoptozės žymenų nustatymo metodų rezultatai buvo gauti vertinant $\Delta Ras1$, $\Delta Ras2$, $\Delta Ras1/2$ ir JT21570 kamienu žūties mechanizmus. Tokie rezultatai leidžia teigti, kad RAS genų mutacijos sustabdo apoptozinės ląstelių žūties programos vykdymą ląstelėse pratęsdamos jų amžių ir sąlygodamos nekrozinio žūties būdo pasirinkimą. Taip pat mūsų tyrimai patvirtina anksčiau iškeltą prielaidą, kad papildoma PDE2 geno kopija gali

išgelbėti PKA mutaciją turintį kamieną nuo programuotos ląstelių žūties (Ma ir kt., 1999). *PDE1* papildomos kopijos įvedimas tokiu efektu nepasižymėjo, ir *JT21569* kamienne apoptozinių ląstelių kiekis buvo ženkliai didesnis nei SP1.

Jei *PDE2* geno inaktyvinimas indukavo apoptozę mielėse esant rūgštinėms sąlygoms, tai *PDE1* inaktyvinimas tokiu efektu nepasižymėjo. Apoptozinių ląstelių kiekis išliko toks kaip ir SP1 kamieno. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas parodė, kad abiejų fosfodiesterazių genų inaktyvinimas sukelia panašų efektą kaip $\Delta PDE1$ kamieno atveju. Apoptozės žymenų analizė atskleidė, kad šiuo atveju dviguba genų mutacija sukėlė labiau nekrozinio žūties būdo atsiradimą $\Delta PDE1/2$ kamieno ląstelėse: $\Delta PDE1/2$ kamienne nustatyta statistiškai patikimai mažiau apoptozinių ląstelių nei $\Delta PDE1$ kamienne.

Didžiausias ankstyvąją apoptozę patyrusių ląstelių kiekis nustatytas mažiausiu gyvybingumu pasižyminčiuose kamieniuose: *Ras2^{Val19}* ir $\Delta PDE2$. Toks didelis apoptozinių ląstelių kiekis populiacijoje rodo, kad net ir tose ląstelėse, kurios mikroskopijos metu buvo įvertintos, kaip gyvos, jau yra prasidėję ankstyvosios programuotos ląstelių žūties procesai. Iš trijų apoptozės žymenų šiek tiek didesnis buvo aktyvius kaspazes turinčių ląstelių kiekis.

Ankstesni tyrimai rodo, kad *Ras2^{Val19}* alelį turinčiose ląstelėse kaupiasi reaktyvusis deguonis (Hlavata ir kt., 2003) ir ženkliai trumpėja ląstelių replikacinis amžius (Laun ir kt., 2001; Jazwinski ir kt., 1999b; Lin ir kt., 2000; Steinkraus ir kt., 2008). Izoliavus tokių ląstelių mitochondrijas paaiškėjo, kad jose drastiškai padidėjęs oksidacines pažaidas patyrusių baltymų kiekis (Hlavata ir kt., 2003). *Ras2^{Val19}* mutantų problemos susidorojant su oksidaciniu stresu gali būti susijusios su dviem nepriklausomais keliais: a) konstitutyviai aktyvia cAMP/PKA sistema, kuri efektyviai mažina STRE elementus turinčių genų ekspresiją, taip pat ir tų, kurie susiję su apsauga nuo oksidacinių pažeidimų (Hasan ir kt., 2002), b) PKA nepriklausomas kelias užrakinantis kvėpavimo procesą nefosforilintoje formoje (Hlavata ir kt., 2003). Mielių ląstelių gyvenimo trukmės analizė parodė, kad padidėjusia *PDE2* ekspresija sulėtina *Ras2^{Val19}* senėjimą. Inaktyvinus *PDE2* geną mažėja kamienų

atsparumas įvairiems stresams (šaldymui-džiovinimui, sunkiesiems metalams, NaCl, karščiui, šalčiui ir t.t.). Įrodyta, kad padidėjęs Ras kelio aktyvumas skatina programuotą ląstelių žūtį ne tik mielėse, bet ir kituose mieliagrybiuose, tokiuose kaip patogeninis *Candida albicans* (Philips at al., 2006).

Mūsų eksperimentais buvo įrodyta, kad dėl streso ženkliai išauga ląstelių mirtingumas su apoptozei būdingais fenotipiniais požymiais. Yra žinoma, kad atsparumas stresui ląstelėje koreliuoja su baziniu cAMP lygiu (Russell ir kt., 1993). Anksčiau įrodyta, kad būtent *PDE2* papildoma kopija gali apsaugoti neaktyvią PKA turinčias ląsteles nuo aktino reguliuojamos apoptozės mielėse (Gourlay, Ayscough 2005). Mūsų atlikti tyrimai rodo, kad papildoma *PDE2* geno kopija atlieka tą patį vaidmenį ir rūgštinio streso sukeltos apoptozės atveju. $\Delta PDE1$ kamiene apoptozinių ląstelių kiekis nesiskyrė nuo SP1, o abiejų fosfodiesterazių genų delecija mažino apoptozinių ląstelių kiekį populiacijoje (Ma ir kt., 1999). Gourlay ir Ayscough parodė, kad apoptozės mielių ląstelėse gali būti išvengta arba inaktyvinant *RAS2*, padidinant *PDE2* ekspresiją, arba inhibuojant kvėpavimo grandinės funkciją (Gourlay and Ayscough 2005).

Kiti autoriai kiek vėliau parodė, kad rūgštinėmis sąlygomis *RAS2* delecija sukelia ląstelių ilgaamžiškumo padidėjimą didindama atsparumą acto rūgščiai (Burtner ir kt., 2009). Šiuo metu yra aktyviai tiriama, kaip acto rūgštis sukelia ląstelių žūtį. Acetatas negali būti tiesiogiai paimamas iš aplinkos, tačiau protonizuota acto rūgštis gali pereiti plazminę membraną sukeldama viduląstelinį rūgštėjimą (Mollapour ir kt., 2006). Toks modelis gali paaiškinti mūsų atliktų tyrimų rezultatus, kai pastovaus 5,4 terpės pH palaikymas, padeda išvengti acto rūgšties toksiškumo.

Mūsų tyrimo duomenis patvirtina ir Burtner su bendraautoriais vėliau atlikti eksperimentai (2009). Terpės buferinimas didina stacionariojoje augimo stadijoje esančių ląstelių su G_1 stadijoje sustabdytu ląstelės ciklu kiekį (Burhans ir kt., 2009). Tokie eksperimentiniai duomenys rodo, kad terpės pH yra susijęs tiek su chronologinio, tiek ir su replikacinio amžiaus reguliacija mielėse. Pripažinta, kad pagrindiniu aplinkos pH mažinančiu ir programuotą

ląstelių žūtį sukeliančiu veiksmu yra acto rūštis (Ludovico ir kt., 2001; Ludovico ir kt., 2002; Granot ir kt., 2003; Knorre ir kt., 2005), tačiau ir kitos ląstelių augimo metu gaminamos organinės rūgštys turi įtakos mielių ląstelių žūčiai. Ši įtaka pasireiškia tuo, kad besikaupiantys malatas, piruvatas, citratas ir t.t. rūgština terpės pH, taip didindami acto rūgšties toksiškumą (Burtner ir kt., 2009). Acto rūgšties toksinio poveikio rezultatas priklauso nuo koncentracijos. Nedidelė acto rūgšties koncentracija (kaip ir kitų toksinų) sukelia apoptozę, tuo tarpu didelė – indukuoja nekrozinį procesą (Ludovico ir kt., 2001).

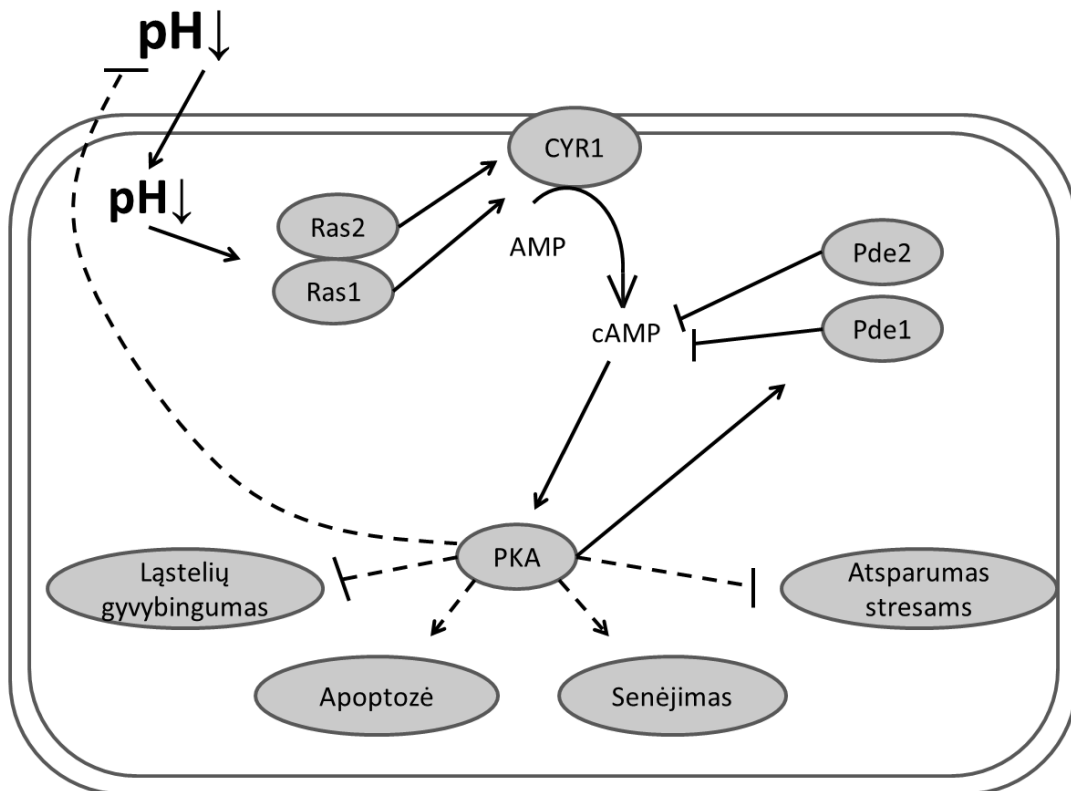
Atskiri Ras/PKA signalinio kelio komponentai yra susiję su kitomis ląstelės sistemomis, reguliuojančiomis žūties mechanizmus mielėse. Mūsų atlikti tyrimai įrodo, kad Ras/PKA signalinis kelias kontroliuoja tiek ląstelių replikacinio, tiek chronologinio senėjimo procesus ir lemia ląstelės žūties programos pasirinkimą esant rūgštinėms aplinkos sąlygoms. Ras/PKA kelio komponentai, reguliuojantys cAMP kiekį ląstelėje sintezės indukcijos (*RAS* genai) ar degradacijos būdu (*PDE* genai) yra tiesiogiai susiję su šių procesų valdymu ląstelėse. Šie tyrimai išplečia mielių, kaip modelinių organizmų, panaudojimo žinduolių ląstelių senėjimo ir žūties procesų tyrimuose galimybes.

Evoliucinį mielių *RAS* genų konservatyvumą rodo tai, kad jie gali būti pakeisti žmogaus onkogeniniu v-Ha-ras genu (Chen ir kt., 1990). Kaip ir kituose modeliniuose organizmuose, taip ir mielėse genetiniai pakitimai gali ženkliai įtakoti jų ilgaamžiškumą. Gyvenimo trukmės pratęsimas mielių ląstelėse įvedus v-Ha-ras pasitarnavo kaip motyvacija tirti galimybę, kad mielių *RAS* genai gali moduluoti ląstelės senėjimo procesus (Steinkraus ir kt., 2008). Senėjimo ir ląstelių žūties procesų konservatyvumas mielių ir aukštesniųjų eukariotų ląstelėse padaro mieles puikia modeline sistema tokiems tyrimams atlikti. Jei replikacinio senėjimo tyrimuose mokslininkai susiduria su asimetrinio ląstelių dalijomosi problema, tai chronologinio senėjimo atveju tokių problemų dėl skirtumų tarp mielių ir aukštesniųjų eukariotų, tarp jų ir žmogaus, neiškyla. Šio darbo metu buvo nustatyta, kad žmogaus onkogeninio v-Ha-ras įvedimas į mielių ląsteles sąlygojo ženklų

ląstelių gyvybingumo padidėjimą, senėjimo proceso sustabdymą ir apoptozės blokovimą mielių ląstelėse. Tai dar kartą patvirtina, kad mielės yra tinkama sistema žinduolių atitinkamiems procesams modeliuoti.

Mielės jau daugelį amžių yra naudojamos maisto ir alkoholio pramonėje. Vyno ir alaus gamyboje mitybinės terpės rūgštėjimas gali būti arba labai pageidaujamas, arba stengiamasi kiek įmanoma jį sumažinti. Acto rūgšties kiekis yra pagrindinis komponentas, įtakojantis vyno kokybę (Dequin, 2001). Per mažas rūgštingumas dažniausiai koreguojamas pridedant organinių rūgščių (Kapsopoulou ir kt., 2007). Tačiau siekiant gauti aukščiausios kokybės vyną tokia procedūra nėra pakankama. Be tam tikro pasiekiamo pH yra būtina ir mielių ląstelių apoptozė, kurios metu į aplinką išskiriamos aminorūgštys ir peptidai, susiję su vyno skonio gerinimu (Tabera ir kt., 2006). Alaus gamyboje, atvirkščiai, per didelis terpės rūgštinimas nėra pageidaujamas reiškinys. Jo stengiamasi išvengti sukeltiant mielių ląstelių žūtį. Todėl kontroliuojami terpės rūgštėjimas ir apoptozė yra itin pageidaujami pramoniniuose mielių kamieniuose.

Mūsų darbo rezultatus pateikiame apibendrintame Ras/PKA signalinio kelio komponentais reguliuojamų taikinių modelyje (38 pav.). Toks išsamus Ras/PKA signalinių komponentų vaidmens nustatymas ląstelių metabolizmo, senėjimo ir žūties procesų reguliacijoje leido susieti šią signalinę sistemą su minėtų procesų valdymu. Buvo įrodyta, kad nuo Ras/PKA signalinio kelio komponentų aktyvumo tiesiogiai priklauso ląstelių gebėjimas reguliuoti savo gyvybines funkcijas tiek laipsniško terpės rūgštėjimo, tiek ir rūgštinio streso metu. *RAS* genai šiomis sąlygomis neigiamai veikia ląstelių gyvybingumą, dėl jų aktyvinimo mielių ląstelėse mažėja metabolinis aktyvumas ir indukuojama apoptozė. Fosfodiesterazė 2 aktyvumas, atvirkščiai, teigiamai veikia metabolinius procesus mielių ląstelėse ir stabdo apoptozės procesą.



38 pav. Ras/PKA signalinio kelio reguliuojamų ląstelės procesų modelis. *RAS* genai aktyvina adenilatciklazę (*CYR1*) ir taip skatina cAMP sintezę. Dvi mielių fosfodiesterazės atlieka cAMP hidrolizės funkciją. Priklausomai nuo cAMP kiekio ląstelėje veikia arba Pde2p, arba Pde1p. Pde1p mielėse yra aktyvinamas grįžtamuju PKA fosforiliniu. PKA aktyvumas lemia apoptozės ir senėjimo procesų skatinimą, mažėjant atsparumui stresams, bendram ląstelių gyvybingumui ir ląstelių metaboliniam aktyvumui rūgštinėje aplinkoje. ↑ teigiama reguliacija, ⊥ neigiama reguliacija. Ištininė linija – poveikis anksčiau aprašytas literatūroje, punktyrinė linija – mūsų darbo metu nustatyti reguliaciniai ryšiai.

Tolimesnis gebėjimas valdyti ląstelių metabolizmo intensyvumą, gyvybingumą ir programuotą ląstelių žūtį leistų panaudoti tokius kamienus kaip modelinę sistemą žmogaus analogiškų procesų tyrimuose, o taip pat leistų šiuos kamienus panaudoti pramoniniams tikslams.

IŠVADOS

Atlikta sisteminė Ras/PKA signalinio kelio komponentų įtakos mielių ląstelių senėjimo procesui ir žūčiai natūraliai rūgštėjančioje aplinkoje ir rūgštinio streso metu analizė:

1. Įrodyta, kad *RAS1* ir *RAS2* genai neigiamai įtakoja ląstelių gyvybingumą natūralaus laipsniško terpės rūgštėjimo metu.
2. Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo padidėjimas dėl *Ras2^{Val19}* mutacijos suaktyvina apoptotinį žūties mechanizmą ir padidina (iki $94,25 \pm 1,84$ %) šiuo būdu žūstančių ląstelių kiekį populiacijoje.
3. *RAS1* ir *RAS2* genų delecijų sąlygotas Ras/PKA signalinio kelio aktyvumo sumažėjimas lemia ląstelių žūtį nekrozės būdu.
4. Fosfodiesterazės 2 aktyvumas yra susijęs su apoptozės proceso stabdymu mielių ląstelėse: esant neaktyviai Pde2p ląstelėse vyrauja apoptozinis ląstelių žūties būdas.
5. Abiejų fosfodiesterazių genų inaktyvinimas indukuoja padidintą ląstelių žūtį nekrozės būdu.

MOKSLINIŲ STRAIPSNIŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

1. **Lastauskienė E., Čitavičius D.** Influence of *RAS* genes on yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell viability in acid environment, *Biologija* 2008; 54, 3, 150-155.
2. **Lastauskienė E., Čitavičius D.** *Saccharomyces cerevisiae* *PDE* genes influence medium acidification and cell viability, *Biologija* 2009; 55, 1, 24–28.

Padėka

Norėčiau padėkoti visiems žmonėms vienaip ar kitaip prisidėjusiems prie šio darbo. Ypatingai dėkoju:

Savo darbo vadovui Donaldui Čitavičiui už visokeriopą pagalbą, naudingus patarimus ir idėjas, ir už tai, kad „darbas daro gyvenimą saldu“.

Almantui Šiauriui už tėkmės citometrijos eksperimentus. Mindaugui Valiui už konfokalinę mikroskopiją. Lilijai Kalėdienei už moterišką palaikymą ir supratimą. Genetikams už tai, kad visada gera užėiti į svečius, o ypač Veronikai Dedonytei už fluorescencinės mikroskopijos ir lietuvių kalbos pamokėles. Julijai – už anglišką versiją.

Pirmo aukšto chebrai už mokslines diskusijas penktadienio vakarais.

Ypatingai dėkinga esu: savo vyrui Linui – už nuolatinę paramą ir supratimą. Už tai kad tikėjo, kai nebetikėjau pati. Savo vaikams – kad visgi leido parašyti šią disertaciją. Savo tėvams ir broliui, kurie visada buvo šalia.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aguilaniu H., Gustafson L., Rigoulet M., Nystrom T. (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, 299:1751–53.
2. Airoidi E.M., Huttenhower C., Gresham D., Lu Ch., Caudy A.A., Dunham M.J., Broach J.R., Botstein D., Troyanskaya O.G. (2009) Predicting cellular growth from gene expression signatures. *PLoS Computational Biology*, 5, e10000257.
3. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA. (2003) Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by caloric restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 423, 181–85.
4. Andrews B. and Measday V. (1998) The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends in Genet.* 14, 66-72.
5. Arst H. N. JR., Bignell E., Tilburn J. (1994) Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 245, 787-790.
6. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (2000) *Yeast: characteristics and identification*. 3rd end. Cambridge: Cambridge university press.
7. Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie F., Jacquet M. (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 1044-1052.
8. Bonawitz N.D., Chatenay-Lapointe M., Pan Y. Shadel G.S. (2007) Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab.*, 5, 265-277.
9. Boutelet F., Petitjean A., Hilger F. (1985) Yeast *cdc35* mutants are defective in adenylate cyclase and are allelic with *cyr1* mutants while *CAS1*, a new gene, is involved in the regulation of adenylate cyclase. *EMBO J.* 4, 2635-2641.
10. Broach J. R. (1991) *RAS* genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends in Genetics* 7, 28-33.
11. Broek D., Toda T., Michaeli T., Levin L., Birchmeier C., Zoller M., Powers S., Wigler M. (1987) The *Saccharomyces cerevisiae* *CDC25* gene products regulate the RAS-adenylate cyclase pathway. *Cell*, 48, 789-799.
12. Burhans W.C., Weinberger M. (2009) Acetic acid effects on aging in budding yeast. *Cell Cycle*, 8, 1-3.
13. Burtner Ch.R., Murakami Ch.J., Kennedy B.K., Kaerberlein M. (2009) A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 8, 1-15.
14. Caddick M. X., Brownlee A. G., Arst H. N. (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 203, 346-353.
15. Carman G. M. (1997) Phosphatidate phosphatases and diacylglycerol pyrophosphate phosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* and *Esherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 1348, 45-55.

16. Castrejon F., Gomez A., Sanz M., Duran A., Roncero C. (2006) The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryot. Cell*, 5, 507–517.
17. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 12, 5522-5531.
18. Charbonneau H., Iyer N., Walsh K., Beavo J. (1986) Identification of a conserved domain among cyclic nucleotide phosphodiesterases from diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9308-9312.
19. Chen J.C., Powers T. (2006) Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*, *Curr. Genet.*, 49, 281-293.
20. Chen J.B., Sun J., Jazwinski S.M. (1990) Prolongation of the yeast life span by the v-Ha-RAS. *Molec. Microbiol.*, 4, 2081-2086.
21. Cheng C., Fabrizio P., Ge H., Longo V.D., Li M.N. (2007a) Influence of transcription modification in long-lived yeast strains from their expression profiles. *BMC Genomics*, 8, 219.
22. Cheng C., Fabrizio P., Ge H., Longo V.D., Li M.N. (2007b) Significant and systematic expression differentiation in long-lived yeast strains. *PLoS ONE*, 2, 1095.
23. Cheng W-C., Berman SB., Ivanovska I., Jonas EA., Lee SJ., Chen Y., Kaczmarek LK., Pineda F., Hardwick JM. (2006) Mitochondrial factors with dual roles in death and survival, *Oncogene*, 25, 4697-4705.
24. Colombo S., Ma P., Cauwenberg L., Winderickx J., Crauwels M., Teunissen A., Nauwelaers D., de Winde J. H., Gorwa M. F., Colavizza D., Thevelein J. M. (1998) Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17, 3326-3341.
25. Costa V., Moradas-Ferreira P. (2001) oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Asp. Med.*, 22, 217-246.
26. Davis D., Edwards J. E. J., Mitchell A. P., Ibrahim A. S. (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.*, 68, 5953–5959.
27. De Virgilio C., Loewith R. (2006) The TOR signaling network from yeast to man. *IJBCB*, 38, 1476-1481.
28. Del Carratore R., Della Croce C., Simili M., Tattcini E., Scavuzzo M., Sbrana S. (2002) Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. *Mut. Res.*, 513, 183-191.
29. Denison S. H., Negrete-Urtasun S., Mingot J. M., Tilburn J., Mayer W. A. (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.*, 30, 259-264.

30. Denison S. H., Orejas M., Arst H. N. (1995) Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.*, 270, 28519-28522.
31. Dequin S. (2001) the potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56, 577-588.
32. Erjavec N, Nystrom T. (2007) Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 10877–81.
33. Erjavec N., Larsson L., Grantham J., Nystrom T. (2007) Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev.*, 21, 2410–21.
34. Espeso E.A., Roncal T., Diez E., Rainbow L., Bignell E., Alvaro J., Suarez T., Denison S.H., Tilburn J., Arst H.N., Penalva M.A. (2000) On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.*, 19, 719-728.
35. Estruch F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 469-486.
36. Fabrizio P., Liou L.L., Moy V.N., Diaspro A., SelverstoneValentine J., Gralla E.B., Longo V.D. (2003) SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*, 163, 35–46.
37. Fabrizio P., Pozza F., Pletcher S.D., Gendron C.M., Longo V.D. (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 292, 288-290.
38. Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L. L., Diaspro, A., Dossen, J. W., Gralla, E. B., and Longo, V. D. (2004). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 166, 1055–1067.
39. Forsberg H. and Ljungdhal P. O. (2001) Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 40, 91-109.
40. Fraenkel D. G. (1986) Mutants in glucose metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 317-337.
41. Francois J. and Parrou J. L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 125-145.
42. Frohlich K.-U. and Madeo F. (2000) Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behavior. *FEBS Letters*, 47, 6-9.
43. Fujimoto M., Ichikawa A., Tomita K. (1974) Purification and properties of adenosine 39,59-monophosphate phosphodiesterase from Baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 54–63.
44. Garciadéblas B., Rubio F., Quitero F., Banuelos M.A., Haro R., Rodríguez-Navarro A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 236, 363-368.

45. Geymonat M., Wang L., Garreau H., Jacquet M. (1998) Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 30, 855-864.
46. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA.(1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355–60.
47. Goncalves P., Planta R.J. (1998) Starting up yeast glycolysis. *Trends Microb.*, 6, 314-319.
48. Gonze D., Jaquet M., Goldbeter A., (2008) Stochastic modeling of nucleocytoplasmic oscillations of the transcription factor Msn2 in yeast. *Journal of the Royal Society*, 5, 95-109.
49. Gorner W, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schuller C (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.*, 21, 135–144.
50. Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor M. T., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H., Schuller C. (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.*, 12, 586-597.
51. Gourlay C. W., Ayscough K. R. (2005) Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast, *Journal of Cell Science*, 118, 2119-2132.
52. Gourlay C.W., Carpp L.N., Timpson P., Winder S.J., Ayscough K.R. (2004) A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast.. *J. Cell Biol.*, 164, 803–9.
53. Gourlay C.W., Du W., Ayscough K.R. (2006a) Apoptosis in yeast – mechanisms and benefits to a unicellular organism. *Mol. Microbiol.*, 62, 1515-1521.
54. Gourlay W.C., Ayscough K.R. (2006b) Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 6487-6501.
55. Granot D., Levine A., Dor-Hefetz E., Sugar induced apoptosis in yeast cells, 2003, *FEMS yeast research*, 4, 7-13.
56. Griffioen G., Laan R. J., Mager W. H., Planta R. J. (1996) Ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae* shows a biphasic response to nutritional changes. *Microbiol.*, 142, 2279-2287.
57. Griffioen, G., J. M. Thevelein. (2002) Molecular mechanisms controlling the localization of protein kinase A. *Curr. Genet.*, 41, 199–207.
58. Hall D. D., Markwardt D. D., Parviz F., Heideman W. (1998) Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 17, 4370-4378.
59. Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., Nelson J.F., Astle C.M., Flurkey K., Nadon N.L., Wilkinson J.E., Frenkel K., Carter C.S. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460, 392–395.

60. Hasan R., Leroy C., Isnard A., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B. (2002) The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol.*, 45, 233-241.
61. Heale S.M., Stateva L.I., Oliver S.G. (1994) Introduction of YACs into intact yeast cells by a procedure, which shows low levels of recombinagenicity and co-transformation. *Nucleic. Acids. Res.*, 23, 5011–5015.
62. Herker E., Jungwirth H., Lehmann K.A., Maldener C., Frohlich K.U., Wissing S., Buttner S., Fehr M., Sigrist S., Madeo F.(2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol.*, 164, 501-507.
63. Herman P. K. (2002) Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 602-607.
64. Herman P. K. and Rine J. (1997) Yeast spore germination: a requirement for ras protein activity during re-entry into the cell cycle. *EMBO J.*, 16, 6171-6181.
65. Hlavata L., Aguilaniu H., Pichova A., Nystrom Th. (2003) The oncogenic RAS2^{Val19} mutation locks respiration independently of PKA, in a mode prone to generate ROS. *EMBO J.*, 22, 3337-3345.
66. Ho J., Bretscher A. (2001) Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton though the stress response pathway. *Mol. Biol. Cell*, 12, 1541-1555.
67. Hong S.K., Han S.B., Snyder M., Choi E.Y. (1999) SHC1, a high pH inducible gene required for growth at alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Cell Biol. Commun.*, 255, 116-122.
68. Howard S. C., Budovskaya Y.V., Chang Y.W., Herman P.K. (2002) The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II is required for stationary phase entry and functionally interacts with the Ras/PKA signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 277, 19488–19497.
69. Hubberstey A.V., Mottilo E.P. (2002) Cyclase-assotiated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerisation. *FASEB J.*, 16, 487-499.
70. Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4569–4574.
71. Yamaki M., Umehara T., Chimura T., Horikoshi M. (2001) Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone *ASF1/CIA1*. *Genes to Cells* 6, 1043-1054
72. Yang W.-L., Iacono L., Tang W.-M., Chin K.-V. (1998) Novel function of the regulatory subunit of protein kinase A: regulation of cytochrome *c* oxidase activity and cytochrome *c* release. *Biochem.* 37, 14175-14180
73. Jazwinski S. M. (1999a) The *RAS* genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiol. Aging*, 20, 471-478.
74. Jazwinski S. M. (1999b) Molecular mechanisms of yeast longevity. *Trends Microbiol.*, 7, 247-252.
75. Jazwinski S. M. (2001) New clues to old yeast. *Mech. Age. Develop.*, 122, 865-882.

76. Jazwinski S. M. (2002) Growing old: metabolic control and yeast aging. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 769-792.
77. Jazwinski S. M., (2004) Metabolic control and gene dysregulation in yeast aging, *Annals New York Academy of Science*.
78. Jazwinski S. M., Kim S., Lai C.-Y., Benguria A. (1998) Epigenetic stratification: the role of individual change in the biological aging process. *Exp. Gerontol.*, 33, 571-580
79. Jones D.L., Petty J., Hoyle D.C. (2003) Transcriptome profiling of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with a constitutively activated Ras/cAMP-dependent pathway. *Physiol. Genom.*, 16, 107–118.
80. Jones D.L., Petty J., Hoyle D.C. (2004) Genome-wide analysis of the effects of heat shock on a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with a constitutively activated cAMP-dependent pathway. *Comp. Funct. Genom.*, 5, 419–431.
81. Jorgensen P., Nishikawa J.L., Breitkreutz B.J., Tyers M. (2002) Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science*, 297, 395–400.
82. Jung W.H., Warn P., Ragni E., Popolo L., Nunn C.D., Turner M.P., Stateva L. (2005) Deletion of *PDE2*, the gene encoding the high-affinity cAMP phosphodiesterase, results in changes of the cell wall and membrane in *Candida albicans*. *Yeast*, 22, 285-294.
83. Kaeberlein M, Burtner CR, Kennedy BK. (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet.*, 3, 655–60.
84. Kaeberlein M, Hu D, Kerr EO, Tsuchiya M, Westman EA, ir kt. (2005a) Increased life span due to calorie restriction in respiratory deficient yeast. *PLoS Genet.*, 1, 614–21.
85. Kaeberlein M, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. (2005b) Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mech. Ageing Dev.*, 126, 491–504.
86. Kaeberlein M, Powers RW III, Steffen KK, Westman EA, Hu D, ir kt. (2005c) Regulation of yeast replicative life-span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Genes Dev.*, 13, 2570-80.
87. Kaeberlein M. (2010) Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, 4, 64.
88. Kapsopoulou K., Mourtzini A., Anthoulas M., Nerantzis E. (2007) biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 735-739.
89. Klar A. J. S., Strathern J. N., Hicks J. B. (1984) Developmental pathways in yeast. – In: Losich R., Shapiro L. (eds.), *Microbial development*. – Cold Spring.
90. Klein C. and Struhl K. (1994) Protein kinase A mediates growth-regulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 1920-1928.

91. Knorre D. A., Smirnova E. A., Severin F. F., 2005, Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, 70, 264-266.
92. Kraakman A. L., Lemaire K., Ma P., Teunissen A. V. R. H., Donaton M. C. V., Van Dijck P., Winderickx J., de Winde J. H., Thevelein J. M. (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.*, 32, 1002-1012.
93. Lamb T. M., Mitchell A. P. (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 677–686.
94. Lamb T. M., Xu W., Diamond A., Mitchell A. P. (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, 1850-1856.
95. Lastauskienė E., Čitavičius D. (2008) Influence of *RAS* genes on yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell viability in acid environment. *Biologija*, 50, 150-155.
96. Lastauskienė E., Čitavičius D. (2009) *Saccharomyces cerevisiae* *PDE* genes influence medium acidification and cell viability. *Biologija*, 50, 150-155.
97. Laun P., Pichova A., Madeo F., Fuchs J., Ellinger A., Kohlwein S., Dawes I., Frohlich K.U., Breitenbach M. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.*, 39, 1166-1173.
98. Leist M., Jaattela M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol.*, 2, 589-598.
99. Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P, Thevelein JM (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.*, 16, 293–299.
100. Ligr M., Madeo F., Frohlich E., Hilt W., Frohlich K.-U., Wolf D. H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Letters* 438, 61-65
101. Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by control of yeast cell-wall biogenesis. *Microbiology*, 146, 2133–2146.
102. Lin S.J., Guarente L. (2006) Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PloS Genet.*, 2, e33.
103. Londesborough J., Suoranta K. (1983) The zinc-containing high Km cyclic nucleotide phosphodiesterase of bakers' yeast. *J. Biol. Chem.*, 258, 2966-2972.
104. Londesborough, J., Lukkari, T.M. (1980) The pH and temperature dependence of the activity of the high Km cyclic nucleotide phosphodiesterase of baker's yeast. *J. Biol. Chem.*, 255, 9262–9267.

105. Longo V. D. (1999) Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol. Aging*, 20, 479-486.
106. Lowary P. T. and Widom J. (1989) Higher-order structure of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS USA* 86, 8266-8270
107. Ludovico P., Sousa M. J., Silva M. T., Leao C., Corte-Real M. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiol.*, 147, 2409-2415.
108. Ludovico P., Rodrigues F., Almeida A., Silva M.T., Barrientos A., Corte-Real M. (2002) Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 13, 2598-2606.
109. Ma P., Wera S., Van Dijck P., Thevelein J. M. (1999) The *PDE1*-encoded low- affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol. Biol. Cell.*, 10, 91-104.
110. MacCabe A. P., van den Hombergh J. P. T. W., Tilburn J., Arst H. N., Visser J. (1996) Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol. Gen. Genet.*, 250, 367-374.
111. Madeo F., Frohlich E., Frohlich K.-U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139, 729-734.
112. Madeo F., Frohlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S. J., Wolf D. H. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Biol. Sci.*, 154, 757-767.
113. Madeo F., Herker E., Maldener C., Wissing S., Lachelt S., Herlan M., Fehr M., Lauber K., Sigrist S.J., Wesselborg S., Frohlich K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell.*, 9, 911-917.
114. Martin D.E., Hall. (1995) the expanding TOR signaling network. *Curr.Opin. Microbiol.*, 17, 158-166.
115. Masoro E.J. (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing. Dev.*, 126, 913-922.
116. Matsuyama S., Nouraini S., Reed J. C. (1999) Yeast as a tool of apoptosis research. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 618-623.
117. Mingot J.M., Espeso E.A., Diez E., Penalva M.A. (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 1688-1699.
118. Mollapour M., Phelan J.P., Millson S.H., Piper P.W., Cookie F.T. (2006) weak acid and alkali stress regulates phosphatidylinositol biphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 395, 73-80.
119. Muller S, Zimmermann FK, Boles E (1997) Mutant studies of phosphofructo-2-kinases do not reveal an essential role of fructose- 2,6-

- bisphosphate in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. *Microbiology*, 143, 3055–3061.
120. Munn A.L., Riezman H. (1994) Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J. Cell Biol.*, 127, 373-386.
 121. Murray A.W., Szostak J.W. (1983) Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell*, 34, 961–70.
 122. Narasimhan M.L., Damsz B., Coca M.A., Ibeas J.I., Yun D.J., Pardo J.M. (2001) A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell.*, 8, 921-930.
 123. Negrete-Urtasun S., Denison S. H., Arst H. N. (1997) Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.*, 179, 1832-1835.
 124. Negrete-Urtasun S., Reiter W., Diez E., Denison S. H., Tilburn J. (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.*, 33, 994-1003.
 125. Nelson H., Nelson N. (1990) Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H⁺-ATPase causes conditional lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3503-3507.
 126. Neufeld T. P. and Edgar B. A. (1998) Connections between growth and the cell cycle. *Curr. Op. Cell Biol.*, 10, 784-790.
 127. Neuman-Silberberg F. S., Bhattacharya S., Broach J. (1995) Nutrient availability and the RAS/cyclic AMP pathway both induce expression of ribosomal protein genes but by different mechanisms. *Mol. Cell Biol.*, 15, 3187-3196.
 128. Nikawa J., Cameron S., Toda T., Ferguson K.W., Wigler M. (1987) Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 1, 931-937.
 129. Nystrom T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO. J.*, 24, 1311–17.
 130. Palková, Z., Váchová, L. (2006) Life within a community, benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 806-824.
 131. Park J., Grant Ch., Dawes I.W. (2005) The high affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327, 311-319.
 132. Penalva M. A., Tilburn J., Bignell E., Arst H. N. J. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.*, 16, 291–300.
 133. Penalva M.A., Arst H.N. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Mol. Biol. Rev.*, 66, 426-446.
 134. Penalva M.A., Arst H.N. (2004) Recent advantages in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 425-451.

135. Phillips A.J., Crowe J.D., Ramsdale M. (2006) Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. PNAS, 103, 3, 726-731.
136. Pichova A., Vondrakova D., Breitenbach M. (1997) Mutants in the *Saccharomyces cerevisiae* RAS2 gene influence life span, cytoskeleton, and regulation of mitosis. Can. J. Microbiol. 8, 774-781.
137. Polymenis M. and Schmidt E. V. (1997) Coupling cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. Genes Dev., 11: 2522-2531.
138. Powel C. D., Van Zandycke S. M., Quain D. E., Smart K. A. (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and impact on brewing fermentations. Microbiol., 146, 1023-1234.
139. Raff, M. C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. Nature, 356, 397-400.
140. Ramon A. M., Porta A., Fonzi W. A. (1999) Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. J. Bacteriol., 181, 7524-7530.
141. Rao, N. N., Roberts, M. F., Torriani, A., Yashphe, J. (1993) Effect of *glpT* and *glpD* mutations on expression of the *phoA* gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 175, 74279.
142. Reinders A., Burckert N., Boller T., Wiemken A., Virgilio C. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15 protein kinase. Genes Dev., 12, 2943-2955.
143. Riirro G.F., Corte-Real M., Johanson B. (2006) Charakterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid and hyperosmotic shock. Mol. Biol. Cell, 17, 4584-4591.
144. Robinson L. C., Gibbs J. B., Marshall M. S., Sigal I. S., Tatchell K. (1987) *cdc25*: a component of the Ras-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Science, 235, 1218-1221.
145. Roland F., de Winde J. H., Lemaire K., Ma P., Boles E., Thevelein J. M. (2000) Glucose-induced cAMP signaling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and separable hexose kinase dependent process. Mol. Microbiol., 38, 348-358.
146. Rolland F., Winderickx J., Thevelein J. M. (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. TIBS, 26, 310-317.
147. Rolland F., Winderickx J., Thevelein J. M. (2002) Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeast. FEMS Yeast research, 2, 183-201.
148. Roosen J., Engelen K., Marchal K., Mathys J., Griffioen G., Cameroni E., Thevelein J.M., De Virgilio C., De Moor B., Winderickx J. (2005) PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. Mol. Microbiol., 55, 862-880.
149. Rubenstein E.M., Schmidt M.C. (2010) The glucose signaling and metabolic p[H⁺]lux. The EMBO Journal, 29, 2473-2474.

150. Ruckenstuhl Ch., Carmona-Gutierrez D., Madeo F. (2010) the sweet taste of death: glucose triggers apoptosis during yeast chronological aging. *Aging*, 2, 598-622.
151. Ruis H., Schuller C. (1995) Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 17, 959-965.
152. Ruiz A., Arino J. (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot. Cell* 6, 2175–2183.
153. Rusell M., Bradshaw-Rouse J., Markwardt D., Heideman W. (1993) Changes in gene expression in the Ras/adenylat cyclase system of *Saccharomyces cerevisiae*: correlation with cAMP levels and growth arrest. *Mol. Cell Biol.*, 4, 757-765.
154. Santangelo GM. (2006) Glucose signaling in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 253–282.
155. Sass P., Field J., Nikawa J., Toda T., Wigler, M. (1986) Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 9303–9307.
156. Schmitt E. K., Kempken R., Kuck U. (2001) Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics*, 265, 508–518.
157. Sherman F., Fink, G. R., Hicks J. B. (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
158. Severin F.F., Hyman A.A. (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.*, 12, 233-235.
159. Sillje H. H. W., Paalman J. W. G., Ter Schure E. G., Olsthoorn S. Q. B., Verkleij A. J., Boonstra J. and Verrips C. T. (1999) Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 181, 396-400.
160. Sinclair D. A. (1999) Yeast aging research: recent advances and medical relevance. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 56, 807-818.
161. Sinclair D. A. and Guarente L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles: a cause of aging in yeast. *Exp. Cell Res.*, 91, 1033-1042.
162. Sinclair D. A., Mills K., Guarente L. (1998) Molecular mechanisms of aging. *TIBS*, 23, 131-134.
163. Singer M. A. and Lindquist S. (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell.*, 1, 639-648.
164. Skulachev V.P. (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 23–29.
165. Skulachev V.P. (2002) Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 959, 214-37.
166. Smith A., Ward M. P., Garrett S. (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17, 3556-3564.

167. Stanfel M.N., Shamieh L.S., Kaeberlein M., Kennedy B.K. (2009) The TOR pathway comes of age. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1790, 1067–1074.
168. Stanhill A., Schick N., Engelberg D., 1999, The yeast Ras/Cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 7529-7538.
169. Steinkraus K.A., Kaeberlein M., Kennedy B.K. (2008) Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 24, 29–54.
170. Stevens T.H., Forgac M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 779-808.
171. Su S. S., Mitchell A. P. (1993) Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Res.*, 21, 3789–3797.
172. Suarez T., Penalva M. A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.*, 20, 529–540.
173. Sun J., Kale Sh.P., Childress A.M., Pinswadi Ch., Jazwinski S.M. (1994) Divergent roles of *RAS1* and *RAS2* in yeast longevity. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 18638-18645.
174. Suoranta, K., Londesborough, J. (1984) Purification of intact and nicked forms of a zinc-containing, Mg¹-dependent, low Km cyclic AMP phosphodiesterase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.*, 259, 6964–6971.
175. Suzuki C. K., Rep M., Maarten van Dijn J., Suda, K., Grivell L. A., Schatz G. (1997) ATP-dependent protease that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 118–123.
176. Tabera L., Munoz R., Gonzalez R. (2006) Deletion of *BCY1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotype suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2351-2358.
177. Thevelein J. M. (1991) fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.*, 5, 1301-1307
178. Thevelein J. M. (1992) The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 62, 109-130.
179. Thevelein J. M., de Winde J. H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 33, 904-918.
180. Thevelein J. M., Genade I., Holsbeeck I., Lagatie D., Popova Y., Rolland F., Stolz F., Van de Velde S., Van Dijck P., Vandormael P., Van Nuland A., Van Roey K., Van Zeebroeck G., Yan B. (2005) Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 33, 1.

181. Thevelein J.M. (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast*, 10, 1753-1790.
182. Toda T., Cameron S., Sass P., and Wigler, M. (1988) *SCH9*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Gene Dev.*, 2, 517–527.
183. Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M., Scott J.D., McMullen B., Hurwitz M., Krebs E.G., Wigler M. (1987) Cloning and characterisation of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1371-1377.
184. Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K., Wigler M. (1985) Yeast *RAS* proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, 40, 27-36.
185. Tokiwa G., Tyers M., Volpe T., Futcher B. (1994) Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature*, 371, 342-345.
186. Tomlin G.C., Hamilton C.E., Gardner D.C. (2000) Suppression of sorbitol dependence in a strain bearing a mutation in the *SRBI/PSA1/VIG9* gene encoding GDP-mannose pyrophosphorylase by *PDE2* overexpression suggests a role for the Ras/cAMP signal-transduction pathway in the yeast cell wall biogenesis. *Gen. Mol. Biol.*, 146, 2133-2146.
187. Treton B., Blanchin-Roland S., Lambert M., Lepingle A., Gaillardin C. (2000) Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH*. *Mol. Gen. Genet.*, 263, 505–513.
188. Vachova L., Palkova Z. (2007) Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. *FEMS Yeast Res*, 7, 12-21.
189. Van der Rest M., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, functions and biogenesis. *Microbiol. Rev.*, 59, 304-322.
190. Versele M., de Winde J. H., Thevelein J. M. (1999) A novel regulator of G-protein signaling systems in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J.*, 18, 5577-5591.
191. Versele M., Lemaire K., Thevelein J. M (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO reports*, 7, 574-579.
192. Vershon A. K. and Pierce M. (2000) *Saccharomyces cerevisiae*. Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 334-339.
193. Wei M., Fabrizio P., Hu J., Ge H., Cheng C., Li L. (2008) life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor and Sch9. *PLoS Genet.*, 4, 13.
194. Weinberger M., Mesquita A., Carroll T., Marks L., Yang H., Zhang Z., Ludovico P., Burhans W.C. (2010) Growth signaling promotes

- chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. *Aging*, 2, 709-726.
195. Weindruch R.H., Walford R.L. (1988) The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield IL. Thomas.
 196. Wilson, R. B., Tatchell, K. (1988) *SRA5* encodes the low *K_m* cyclic AMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 505±510.
 197. Wilson, R.B., Renault, G., Jacquet, M., and Tatchell, K. (1993) The *pde2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is allelic to *rca1* and encodes a phosphodiesterase which protects the cell from extracellular cAMP. *FEBS Lett*, 325, 191–195.
 198. Wittenberg C. and Reed S. (1996) Plugging it in: Signaling circuits and the yeast cell cycle. *Curr. Op. Cell Biol.*, 8, 223-23.
 199. Xu W., Mitchell A. P. (2001) Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.*, 183: 6917-6923.
 200. Zurita-Martinez S. A., Cardenas M. E., 2005, Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth, *Eukaryotic Cell*, 4, 63-71.
 201. Zapater M., Clotet J., Escote X., Posas F. (2005) Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle*, 4, 6-7.