



Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

Mikrobiologijos magistrantūros studijų programos

2 kurso studentė

Gabija DIČPETRYTĖ

Magistro darbas

**Mielių baltymo Sup35 GNNQQNY sekos mutantinių variantų
kūrimas ir jų sintezė *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse**

Darbo vadovė lekt. Justina Versockienė
Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra
Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorija

Vilnius

2024

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Amiloidinės ligos žinduoliuose	8
1.1.1. Prioninių ligų įvairovė organizmuose	8
1.1.2. Prioninių baltymų biologinė funkcija ir formavimasis	9
1.1.3. Prioninių ligų nustatymas ir kontrolė.....	9
1.2. Modelinė mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sistema prionams tirti.....	10
1.3. Mielių prionai	10
1.3.1. Mielių [<i>PSI</i> ⁺] prionas	11
1.3.2. [<i>PSI</i> ⁺] priono indukcija	14
1.3.3. Šaperoninių baltymų vaidmuo prionų plitime	14
1.3.4. [<i>PIN</i> ⁺] prionas	15
1.4. Amiloidinių baltymų formavimasis.....	17
1.4.1. Modifikuotų peptidų panaudojimas agregacijos slopinimui.....	18
1.4.2. Agreguotis gebančios baltymų aminorūgščių sekos	19
1.4.3. Mielių baltymo Sup35 N domeno aminorūgščių seka GNNQQNY.....	20
1.5. Mutagenezė.....	23
1.5.1. <i>In vitro</i> mutagenezė.....	23
1.5.2. Mutagenezės pritaikymas mielių baltymo Sup35 tyrimuose	23
1.5.3. Sukurtų mutantinių mielių kamienų panaudojimas tyrimuose	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	26
2.1. Medžiagos.....	26
2.1.1. Reagentai.....	26
2.1.2. Prietaisai.....	26
2.1.3. Kultivavimo terpės ir jų priedai	27
2.1.4. Tirpalai	28
2.1.5. Mielių ir bakterijų kamienai, naudoti šiame darbe	29
2.1.6. Darbe naudotos plazmidės	29
2.1.7. Pradmenys.....	30
2.2. Metodai.....	31
2.2.1. Bakterijų plazmidinės DNR skyrimas	31
2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje	32
2.2.3. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio	32

2.2.4. Taikiniui specifinė mutagenezė	33
2.2.5. Tikslinio geno įterpimas į klonavimo vektorių.....	33
2.2.6. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis	34
2.2.7. Tikslinio geno klonavimas į mielių raiškos vektorių.....	34
2.2.8. Rekombinantinės DNR perkėlimas į kompetentines <i>E. coli</i> DH5α ląsteles cheminės transformacijos būdu.....	35
2.2.9. Bakterinių kolonijų PGR.....	35
2.2.10. Rekombinantinės DNR perkėlimas į kompetentines <i>S. cerevisiae</i> 74-D694 [<i>psi</i>][<i>PIN</i> ⁺] kamieno ląsteles cheminės transformacijos būdu	36
2.2.11. Mielių kolonijų PGR.....	37
2.2.12. Tikslinio baltymo sintezės indukcija vario jonais <i>S. cerevisiae</i> 74-D694 [<i>psi</i>][<i>PIN</i> ⁺] kamieno mielių ląstelėse	38
2.2.13. Visos ląstelės baltymų skyrimas iš mielių šarminės lizės metodu.....	38
2.2.14. Mielių ląstelių baltymų analizė elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (NDS-PAGE)	38
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	40
3.1. Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantinių variantų kūrimas ir klonavimas.....	40
3.1.1. Vietai specifinė mutagenezė	40
3.1.2. Tikslinių genų įterpimas į klonavimo vektorių ir perkėlimas į <i>E. coli</i> DH5α kamieno ląsteles.....	41
3.1.3. Tikslinių genų įterpimas į mielių raiškos vektorių ir perkėlimas į <i>E. coli</i> DH5α kamieno ląsteles.....	45
3.1.4. Sukurtų Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantinių variantų analizė sekoskaitos būdu	48
3.2. Rekombinantinių baltymų sintezės analizė <i>S. cerevisiae</i> 74-D694 [<i>psi</i>][<i>PIN</i> ⁺] kamieno ląstelėse.....	50
3.2.1. Mielių ląstelių cheminė transformacija.....	50
3.2.2. Mielių ląstelių išskirtų baltymų analizė NDS-PAGE	52
IŠVADOS.....	56
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	59
PRIEDAI	70
1 priedas	70
2 priedas	71
3 priedas	72
PADĖKA.....	73

SANTRUMPOS

AChEI	Acetilcholinesterazės inhibitoriai.
Ade	Adeninas.
AIR	Amino imidazolo ribotidas (angl. <i>aminoimidazole ribotide</i>).
Amp	Ampicilinas.
APS	Amonio persulfatas.
A β	Amiloidas β .
bp	Bazių pora.
CJL	Kroicfelto-Jakobo liga (angl. <i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>).
DNR	Deoksiribonukleorūgštis.
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgštis.
eRF1	Eukariotinis translacijos terminacijos faktorius (Sup45 baltymas).
eRF3	Eukariotinis translacijos terminacijos faktorius (Sup35 baltymas).
ET	Endoplazminis tinklas.
GFP	Žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. <i>green fluorescent protein</i>).
GSE	Galvijų spongiforminė encefalopatija (angl. <i>bovine spongiform encephalopathies</i>).
GuHCl	Guanidino hidrokloridas (angl. <i>guanidinium hydrochloride</i>).
HCF	Didelės koncentracijos fibrilės (angl. <i>high concentration fibrils</i>).
His	Histidinas.
Hsp	Karščio šoko baltymas (angl. <i>heat-shock protein</i>).
YNB	Mielių azoto bazė (angl. <i>yeast nitrogen base</i>).
YPAD	Mielių ekstrakto, peptono ir dektrozės terpė, papildyta adenino tirpalu.
YPD	Mielių ekstrakto, peptono ir dektrozės terpė (angl. <i>yeast extract peptone dextrose</i>).
LAG3	Limfocitų-aktyvinimo genas 3 (angl. <i>lymphocyte-activation gene 3</i>).
LB	Turtinga terpė bakterijoms kultivuoti (angl. <i>lysogeny broth</i>).
LCF	Mažos koncentracijos fibrilės (angl. <i>low concentration fibrils</i>).
LD ₅₀	Vidutinė letali dozė, tiriamiesiems duodama vienu metu ir sukelti 50 % testuojamų gyvūnų mirčių.
LEIL	Lėtinė elnių išsekimo liga (angl. <i>chronic wasting disease (CWD)</i>).
Leu	Leucinas.
MD simuliacija	Molekulinės dinamikos simuliacija.
NDS	Natrio dodecilsulfatas (angl. <i>sodium dodecylsulphate, SDS</i>).

nt	Nukleotidas.
PAGE	Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje.
PEG4000	4000 molinės masės polietilenglikolis.
PGR	Polimerazės grandininė reakcija.
PIN	[PSI ⁺] induktorius (angl. [PSI ⁺] <i>inducibility</i>).
PrD	Prioninis domenas.
PrP	Priono baltymas arba proteazei atsparus baltymas (angl. <i>prion protein or protease-resistant protein</i>).
PrP ^C	Ląstelinis priono baltymas (natyvus) (angl. <i>prion protein cellular</i>).
PrP ^{Sc}	Skrepi ligos priono baltymas (pakitusios struktūros) (angl. <i>prion protein scrapie</i>).
ROS	Reaktyvios deguonies rūšys (angl. <i>reactive oxygen species</i>).
SAICAR sintazė	Fosforibozilaminoimidazolo-sukcinkarboksamido sintazė (angl. <i>phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase</i>).
SC	Sintetinė turtinga terpė (angl. <i>synthetic complete</i>).
TAE buferis	Tris-acetato-EDTA buferis.
TAE	Transmisinė audinių encefalopatija (angl. <i>transmissible mink encephalopathies</i>).
TEMED	Tetrametiletilendiaminas.
ThT	Tioflavinas T.
Ty	Mielių transpozoni (angl. <i>yeast transposone</i>).
Trp	Triptofanas.
TSE	Transmisinės spongiforminės encefalopatijos (angl. <i>transmissible spongiform encephalopathies</i>).
Ura	Uracilas.
UV	Ultravioletiniai spinduliai.

IVADAS

Prionai – tai netaisyklingai susilankstę baltymai, kurie agreguodamiesi sudaro amiloidines fibriles. Šie baltymai sukelia transmisines spongiformines encefalopatijas (TSE). Žmonių Krocifelto-Jakobo liga ir avių skrepi liga yra seniausios žinomos prioninės ligos. Dar viena prionų sukeliama liga – galvijų spongiforminė encefalopatija (GSE) – yra žinoma kaip liga, 1992 m. sukėlusią epidemiją Jungtinėje Karalystėje (Babelhadj ir kt., 2018).

Žinduolių prioniniai baltymai yra tiriami jau gana seniai, tačiau vis dar nėra suprantamas jų veikimas. Paprastesnei prionų analizei yra pasitelkiamos įvairios modelinės sistemos, tokios kaip *Saccharomyces cerevisiae* mielių ląstelės, kuriose atliktų tyrimų rezultatai yra pritaikomi plečiant savo žinias apie aukštesniųjų eukariotų prionus. Dabar yra atrasta daugiau nei 10 mielių prionų ir vis atrandama naujų (Wickner ir kt., 2020). Vienas išsamiausiai ištirtų ir labiausiai pritaikytų prioninių baltymų tyrimams atlikti yra mielių baltymas Sup35, kuris dar vadinamas [*PSI*⁺]. Nustatyta, kad skirtingai nei žinduolių prionai, mielių prionai nėra mirtini – jie ląstelėms padeda prisitaikyti prie aplinkos ir išgyventi (Eaglestone ir kt., 1999). Sup35 baltymas yra sudarytas iš trijų domenų: 1 – N domeno, kuris yra būtinas [*PSI*⁺] priono atsiradimui, 2 – M domenas, kuris svarbus [*PSI*⁺] priono plitimui ir 3 – C domenas, kuris yra gyvybiškai svarbus ląstelei ir atsakingas už transliacijos terminaciją (Ter-Avanesyan ir kt., 1993). Sup35N domeno aminorūgščių seka GNNQQNY (apima nuo 7 iki 13 liekanos) yra pakankama amiloidinei fibrilei susidaryti. Ši seka dažnai naudojama *in vitro* arba molekulinės dinamikos simuliacijos tyrimuose (Balbirnie ir kt., 2001; Morris ir kt., 2013). Literatūros šaltiniuose teigiama, kad tam tikras GNNQQNY sekos aminorūgštis pakeitus alanino aminorūgštimi, turėtų pasikeisti amiloidinės fibrilės stabilumas, t.y. būtų suardoma sterinio užtrauktuko struktūra, kuri svarbi priono agregavimosi procese (Zheng ir kt., 2006). Kadangi ši hipotezė iškelta ir tikrinta *in vitro* sistemoje, pasirinkta sukurti Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantinius variantus *in vivo* sistemoje. Tokie sukurti mutantiniai variantai, naudojami tolesniuose tyrimuose, galėtų atnešti daugiau žinių apie šiuo metu egzistuojančius kol kas tik teorinius mechanizmus.

Šio magistro darbo tyrimai buvo atliekami Vilniaus universiteto Biomokslų institute, Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijoje.

Darbo tikslas:

Atlikti Sup35 baltymo N domeno N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutagenezę bei nustatyti mutantinių Sup35GFP baltymų sintezę *Saccharomyces cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

1. Įvesti tikslines taškines N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijas *SUP35-GFP* gene, naudojant vietai specifinės mutagenezės PGR metodą.
2. Mutuotus genus *SUP35N8A-GFP*, *SUP35N9A-GFP*, *SUP35Q10A-GFP*, *SUP35Q11A-GFP* įterpti į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt ir pagausinti *Escherichia coli* DH5α ląstelėse.
3. Mutuotus genus *SUP35N8A-GFP*, *SUP35N9A-GFP*, *SUP35Q10A-GFP*, *SUP35Q11A-GFP* įterpti į raiškos vektorių pRSCup vektorių ir pagausinti *E. coli* DH5α ląstelėse.
4. pRSCupSup35N8A-GFP, pRSCupSup35N9A-GFP, pRSCupSup35Q10A-GFP, pRSCupSup35Q11A-GFP perkelti į *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląsteles ir sekoskaitos būdu patvirtinti mutacijų buvimą.
5. Įvertinti Sup35N8A-GFP, Sup35N9A-GFP, Sup35Q10A-GFP ir Sup35Q11A-GFP baltymų sintezę *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno mielių ląstelėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amiloidinės ligos žinduoliuose

Dauguma neurodegeneracinių ligų yra charakterizuojamos netaisyklingai susilanksčiusių baltymų agregacija. Tokie agregatai vadinami amiloidais. Neurodegeneracinėms ligoms priklauso tiek prioninės ligos (žmonių Krocifelto-Jakobo liga, galvijų spongiforminė encefalopatija arba avių skrepi liga), tiek neprioninės ligos – amiloidozės (Alzheimerio, Parkinsono ligos arba tauopatija). Pagrindinis prioninių ir neprioninių ligų skirtumas yra tas, kad prioninės ligos, manoma, yra užkrečiamos, o neprioninės ligos – neužkrečiamos (Espargaró ir kt., 2016). Šiame darbe daugiausiai nagrinėjami prionai, tačiau svarbu paminėti, kad nors amiloidogeniniai baltymai struktūriškai ir funkciškai yra nesusiję, jie sudaro morfologiškai panašias amiloidines fibriles (Kushnirov ir kt., 2007).

1.1.1. Prioninių ligų įvairovė organizmuose

Prionai yra infekcinės baltyminės dalelės, gebančios save replikuoti ir tokiu būdu plisti kaip infekcija. Prionai yra aptinkami nervinio audinio ląstelėse, tačiau gali pakeisti savo struktūrą dėl genetiškai nulemtų ar įgytų veiksnių. Dėl šių priežasčių prionai gali sukelti žmonių ir gyvulių ligas, sutrikdydami neuronų funkcionavimą, sukeldami neuronų degeneraciją bei smegenų vakuolizaciją (Ma ir Wang, 2011; Soto ir Satani, 2012). Žinduoliams prionai sukelia transmisines spongiformines encefalopatijas (toliau – TSE) – mirtinas neurodegeneracines ligas (*1 priedas – 1.1 lentelė*). Gyvūnų naujų prioninių ligų protrūkių ar formų kilmė dažnai yra neaiški ir nenuspėjama, ką parodo dar gana neseniai Skandinavijoje atsiradusi lėtinė elnių išsekimo liga (LEIL) (Benestad ir kt., 2016) ir Alžyre pripažinta nauja kupranugarių prioninė liga (Babelhadj ir kt., 2018). Prionų sukeliamomis ligomis gali sirgti ir žmonės, jos skirstomos į tris bendras kategorijas: sporadines, genetines ir įgytas (Hasbun ir kt., 2021).

Ilgą laiką trūko įrodymų, kurie patvirtintų ryšį tarp žmonių ir kitų gyvūnų prioninių ligų, todėl buvo manoma, kad TSE nėra zoonozinės. Tačiau tai buvo paneigta, kai 1996 m. GSE buvo pripažinta priežastimi, sukėlusia naują žmonių prioninę ligą – variantinę Krocifelto-Jakobo ligą. Ši liga sukėlė beprecedentę visuomenės sveikatos krizę Europoje (Will ir kt., 1990; Kumagai ir kt., 2019). Dar 1992 m. Jungtinėje Karalystėje buvo užfiksuota GSE epidemija. Buvo bandoma suvaldyti situaciją, tačiau liga vis vien plito per, manoma, paskerstų gyvulių mėsos ir kaulų miltų pašarą. *1 lentelėje (1 priedas)* yra pateiktos ožkų, nežmoginių primatų, audinių bei laukinių galvijų ir kačių rūšys, kurios prioninėmis ligomis užsikrėtė per pašarus, užterštus GSE sergančių galvijų prionais (Babelhadj ir kt., 2018; Kumagai ir kt., 2019).

1.1.2. Prioninių baltymų biologinė funkcija ir formavimasis

Žmonių 20 chromosomoje esantis genas *PRNP* koduoja priono baltymą – PrP, kurio netaisyklinga forma yra žinoma kaip prioninių ligų sukėlėjas. Nors PrP yra tiriamas dešimtmečius, jo funkcija vis dar nėra pilnai suprasta, tačiau manoma, kad šis baltymas padeda transportuoti varį į ląsteles bei apsaugo neuronines ląsteles nuo pažeidimų (*PRNP* gene: MedlinePlus Genetics). Yra nustatytos kelios PrP formos. Normali baltymo forma dažniausiai literatūroje sutinkama ląstelinio (angl. *cellular*) PrP^C pavadinimu, kad būtų atskiriama nuo netinkamai susilanksčiusių baltymo formų, kurios bendrai yra vadinamos PrP^{Sc}. Šių netaisyklingų baltymų kaupimasis yra pagrindinis TSE patogenezės požymis (Cancellotti ir kt., 2007; Mahabadi ir Taghibiglou, 2020).

PRNP geno koduojančiame regione buvo nustatytos skirtingos patogeninės mutacijos. Dėl mutacijų gali būti pakeičiama viena PrP^C baltymo aminorūgšties liekana, įterpiamos ar ištrinamos aminorūgštys arba gali susidaryti neįprastos trumpesnės baltymo versijos. Pagrindinis infekcinių, paveldimų ir sporadinių prioninių ligų patogenezės veiksnys yra klaidingas normalios PrP^C formos susilankstymas į proteazėms atsparią bei turinčią daug β-klosčių izoformą PrP^{Sc}. Manoma, kad netinkamai susilanksčiusi baltymo forma gali prisijungti prie normalaus PrP^C ir skatinti jo transformaciją į PrP^{Sc}. Prioninių baltymų agregatai yra toksiški neuronų ląstelėms, todėl šios žūsta. Žuvusios ląstelės yra suardomos ir smegenų audinyje susidaro mažos kempinė primenančios skylės (vakuolės). Paveldimų prioninių ligų formų atveju, *PRNP* geno genetinės mutacijos gali sukelti konformacinius pokyčius, tačiau šis procesas dar nėra visiškai suprantamas (Mahabadi ir Taghibiglou, 2020).

1.1.3. Prioninių ligų nustatymas ir kontrolė

Prioninių ligų nustatymą apsunkina ilgas inkubacinis laikotarpis (5–40 metų). Dėl šios priežasties liga gali būti pastebėta per vėlai, nes pasirodžius pirmiesiems ryškesniems simptomams, liga trunka apie 12–14 mėnesių ir susirgusįjį išstinka mirtis (Prion Diseases | Memory and Aging Center).

Visgi yra pritaikytų metodų, kuriais galima nustatyti prioninių baltymų sukeltas ligas. Dažniausiai prioninės ligos yra patvirtinamos paimant smegenų audinio mėginį biopsijos metu arba po mirties. Taip pat gali būti atliekama smegenų magnetinio rezonanso tomografija, juosmeninė punkcija, elektroencefalograma, kraujo tyrimai arba neurologiniai ir vizualiniai tyrimai, siekiant patikrinti nervų pažeidimus ir regėjimo praradimą (Prion Diseases | Johns Hopkins Medicine).

Ladner-Keay ir kt. (2018) teigia, kad nepaisant atliktų didelio masto antiprioninių vaistų patikros pastangų siekiant nustatyti naujas potencialias molekules, šiuo metu nėra vaistų, skirtų prionų ligoms gydyti. Klinikinių tyrimų su žmonėmis metu, kuriuose buvo tiriama tokie perspektyvūs antiprioniniai junginiai, kaip flupirtinas (Otto ir kt., 2004), pentozano polisulfatas (Bone ir kt., 2008),

kvinakrinas (Geschwind ir kt., 2013; S Haïk ir kt., 2004) ir doksiciklinas (Stéphane Haïk ir kt., 2014), reikšmingo pacientų rezultatų pagerėjimo nenustatyta.

1.2. Modelinė mielių *Saccharomyces cerevisiae* sistema prionams tirti

Mielės *S. cerevisiae* kaip modelinė sistema yra patogi dėl tokių savybių kaip greitas ląstelių augimas, jų sklaida, pigus ir paprastas kultivavimas, mutantų izoliacija bei labai universali DNR transformacijos sistema. Taip pat mielės yra nepatogeninės, todėl nebūtinai aukštas apsaugos lygis dirbant su jomis (Schneider, 2004). Kovojuant su neurodegeneracinėmis ligomis labai svarbu suprasti molekulinis mechanizmus, kuriais grindžiamas amiloidinių struktūrų vystymasis ir prionų replikacija. Tiriant šiuos procesus, mielės *S. cerevisiae* pasirodė kaip tinkamas modelinis organizmas (Lemarre ir kt., 2020). Daugelis natūralių mielių prionų savybių yra panašios į žinduolių prionų (Tuite ir Serio, 2010), o baltymų kokybės kontrolės mechanizmas, susijęs su jų dauginimu, yra konservatyvus žinduoliuose ir mielėse (Chernova ir kt., 2019).

Pirmieji mielių prionai buvo atrasti ir aprašyti jau gana seniai, todėl jau daugiau nei du dešimtmečius vis tobulinama mielių prionų domenų agregacijos ir plitimo analizės technologija mielėse. Šie mielių modeliai pasirodė kaip veiksmingos ir ekonomiškios platformos tiriant galimas į prionus panašias ir daugelio su neurodegeneracinėmis ligomis susijusių baltymų ypatybes (Monahan ir kt., 2018).

1.3. Mielių prionai

Mielių prionai yra paveldimi endogeniniai amiloidai. Branduolinė amiloidinių fibrilių polimerizacija yra mielių prionų ir žinduolių amiloidų paveldimumo molekulinis pagrindas. Amiloidinėje būsenoje fenotipinės prionų gamybos pasekmės dažnai atsispindi kaip baltymų funkcijos praradimas. Mielių prionai yra gera pavyzdinė sistema tiriant amiloido gamybos ir sklaidos procesus, kurie dėl lengvų genetinių ir fenotipinių tyrimų iš esmės pritaikomi žinduolių ir žmonių ligoms gydyti (Chernova ir kt., 2014, 2019).

1996 metais Wickner (1996) pasiūlė genetinius kriterijus, pagal kuriuos būtų galima identifikuoti mielių prionus bei teigė, kad [*URE*⁺] ir [*PSI*⁺] atitinka šiuos kriterijus. Infekcinis baltymas (prionas) turėtų būti ne Mendeliniu būdu perduodamas genetinis elementas, kaip ir kiti mielių infekciniai elementai. Prionas turėtų atitikti tokius kriterijus:

- 1. Grįžtama prionų eliminacija.** Nors prionas ir yra eliminuojamas, jis turėtų gebėti dar kartą atsirasti (nedideliu dažniu) kuriame nors iš kamienų, kurie buvo naudojami eliminacijai atlikti.
- 2. Perteklinė natyvių baltymų gamyba padidina prionų susidarymo dažnį.** Manoma, kad priono susidarymas yra nepertraukiamas procesas, kurio metu normali forma yra retai

pakeičiama į priono formą. Tačiau atsiradęs bent vienas prioninės formos baltymas gali pakeisti normalias molekules ląstelėje į priono formą. Taigi, prionų formos atsiradimo dažnis turėtų padidėti, nes didėja ląstelėje esančios normalios formos kiekis.

- 3. Ryšys tarp priono baltymo ir jį koduojančio chromosominio geno.** Natyvios baltymo formos chromosominis genas yra būtinas priono atsiradimui, nes prionai plinta keisdami naujai susintetinto natyvaus baltymo konformaciją į prioninę formą. Be natyvios baltymo formos šaltinio, prioninio baltymo atsiradimo dažnis, ląstelėms dauginantis, vis mažėtų, nes būtų vis rečiau perduodamas naujoms ląstelėms. Tiek ląstelės, kurios turi prioninės formos baltymus, tiek ląstelės, turinčios mutavusį natyvios baltymo formos geną, neturės natyvios formos baltymo, todėl ląstelių fenotipai bus panašūs. Toks ryšys yra priešingas ryšiui, būdingam nukleorūgščių replikonams.

Svarbus žinduolių ir mielių prionų panašumas yra tas, kad jie sudaro ne tik vieną prionų konformaciją, bet ir struktūriškai susijusių, tačiau skirtingų konformacijų rinkinį, žinomą kaip prionų variantai (Derkatch ir kt., 1996). Teigiama, kad mielių prionų unikalios baltymų klostės sukuria skirtingų, bet susijusių prionų fenotipų rinkinį (Tessier ir Lindquist, 2009).

Manoma, kad prioninė baltymų forma gali būti žalinga daugumoje aplinkų, tačiau taip pat ji gali padidinti ląstelių dauginimąsi tam tikroje atšiaurioje aplinkoje (Lancaster ir kt., 2010). Derkatch ir kt. (2000), remdamiesi Eaglestone ir kt. (1999), pažymėjo, kad kai kurie *S. cerevisiae* kamienai, turintys [*PSI*⁺], pasižymėjo didesniu išgyvenamumu aukštesnėse temperatūrose arba esant didesnėms etanolio koncentracijoms.

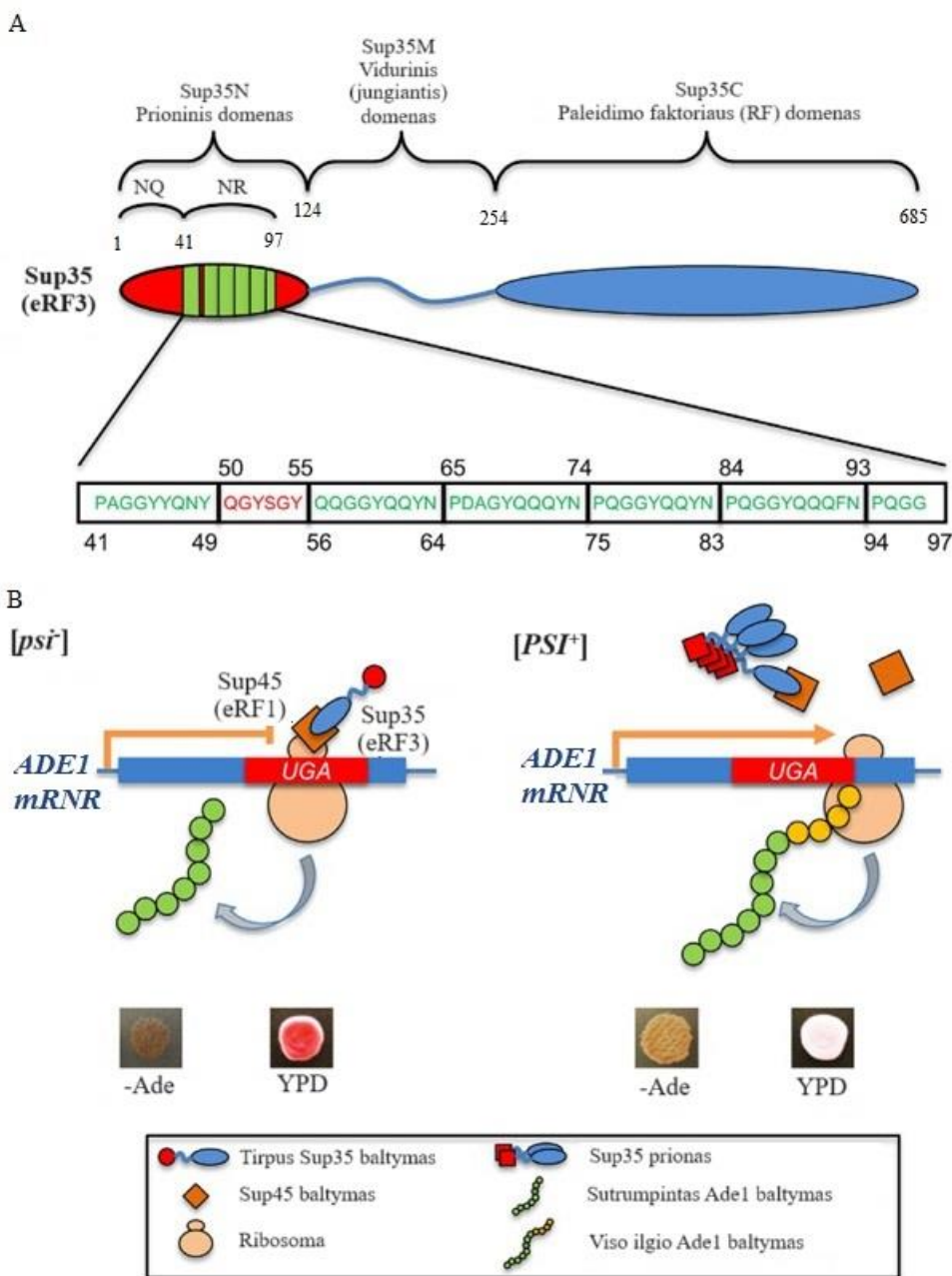
Toliau darbe aprašomi du mielių prionai – [*PSI*⁺] ir jo induktorius [*PIN*⁺].

1.3.1. Mielių [*PSI*⁺] prionas

1965 m. buvo atrastas [*PSI*⁺] prionas, kuris dabar yra nuodugniai ištirtas (Cox, 1964; Cox ir Tuite, 2018), o gauti rezultatai tiriant [*PSI*⁺] buvo labai svarbūs plėtojant prionų biologiją. Svarbu pabrėžti, kad [*PSI*⁺] prionu pripažintas tik 1996 m., iki tol jis buvo laikomas ne Mendelinu paveldimu elementu (Wickner, 1996). Šis mielių prionas yra siejamas su Sup35 baltymo oligomerizacija ir funkcijos praradimu. Sup35 yra transliacijos terminacijos faktorius, taip pat dar žinomas kaip eukariotinis transliacijos terminacijos faktorius – eRF3 (Nevzglyadova ir kt. 2011; Lemarre ir kt., 2020). Šis baltymas yra sudarytas iš trijų domenų (*1.1 pav. A*):

- 1. Prioninis domenas**, arba PrD N-gale (Sup35N), kuris yra turtingas asparagino (N) ir glutamino (Q) aminorūgščių likučiais (NQ) bei turintis oligopeptidinių pasikartojimų (NR);
- 2. Vidurinis jungiantysis domenas** (Sup35M) – tai regionas, turtingas krūvį turinčiomis aminorūgščių liekanomis;

3. C-galinis paleidimo faktoriaus (angl. *release factor*) domenas (Sup35C, arba RF), kuris yra labai svarbus translacijos terminacijai bei ląstelės gyvybingumo palaikymui.

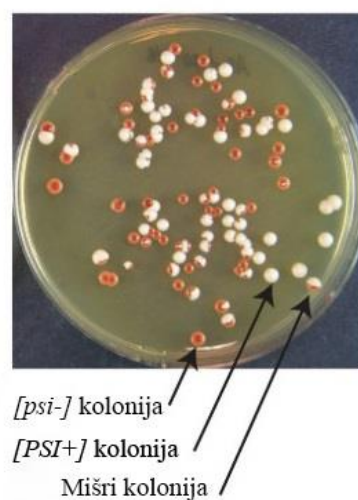


1.1 pav. Sup35/[PSI⁺] sistema mielėse. A – struktūrinė ir funkcinė mielių Sup35 baltymo sandara. NQ – vieta, gausi asparaginu ir glutaminu, NR – oligopeptidų pasikartojimų regionas (pakartojimai pažymėti žaliais langeliais). B – [PSI⁺] priono fenotipinio aptikimo tyrimas. Kairėje – tirpus Sup35 (eRF3) kartu su Sup45 (eRF1) veikia kaip translacijos terminacijos komplekso dalis [*psi*⁻] mielių ląstelėje, turinčioje priešlaikinį baigties kodoną *ADE1* gene. Nuskaičius šį priešlaikinį baigties kodoną, susidaro sutrumpintas Ade1 baltymas, dėl kurio mielių ląstelės negali augti terpėje, kurioje trūksta adenino (-Ade), ląstelės ima formuoti raudonos spalvos kolonijas (dėl raudono pigmento, kuris yra polimerizuotas tarpinis adenino biosintezės produktas, susikaupimo) augdamos turtingoje YPD terpėje. Dešinėje – Sup35 baltymo agregacija [PSI⁺] ląstelėse sumažina translacijos terminacijos komplekso gebėjimą pasiekti transliuojančias ribosomas, todėl priešlaikinis baigties kodonas nėra nuskaitytas. Ribosomos susintetina viso ilgio Ade1 baltymą, todėl ląstelės gali išgyventi terpėje be adenino (-Ade), nes geba pačios jį susintetinti bei ląstelės nebekaupia raudono pigmento ir formuoja baltos spalvos kolonijas, augdamos ant turtingos YPD terpės (adaptuota pagal Chernoff ir kt., 2021).

Sup35N dažniausiai yra bestruktūris, tačiau gali įgauti kryžminę- β konformaciją (angl. *cross- β conformation*), kas sukuria amiloidinės fibrilės ašį. Manoma, kad Sup35N subdomenas NQ yra daugiausiai atsakingas už amiloidų agregaciją, o kitas subdomenas – NR – yra svarbus prioninės būsenos plitimui (Osherovich ir kt., 2004; Toyama ir kt., 2007) greičiausiai dėl sąveikos su šaperoniniu aparatu. Įkrautos aminorūgščių liekanos Sup35M domene reaguoja kaip pH sensoriai, lengvinantys atsistatymą po pH streso. Tuo tarpu, normaliomis sąlygomis, Sup35M padeda baltymui išlikti tirpioje būsenoje (Franzmann ir kt., 2018). Kai Sup35N įgauna prioninę konformaciją, jis yra imobilizuojamas į netirpius pluoštinius (angl. *fibrous*) agregatus, o tai trukdo pasiekti ribosomą, todėl baigties kodonas nebūna nuskaitomas.

Sup35 jungiasi prie Sup45 baltymo (dar žinomas kaip eRF1) ir sudaro kompleksą, kurio funkcija yra baltymų translacijos metu atpažinti baigties kodoną ir atskirti polipeptidinę grandinę nuo ribosomos (1.1 pav. B) (Tessier ir Lindquist, 2009). Sup35 baltymo konformacinis pokytis pakeičia šį baltymą į tokią formą, kuri susirenka į amiloidines fibriles (Derkatch ir kt., 1996). Susiformavus agregatams, atsiranda defektų nuskaitant terminacijos kodonus (Will ir kt., 1990). Kad procesus, vykstančius ląstelėse, būtų galima lengviau analizuoti, yra naudojamos mielių *S. cerevisiae* Ade mutantų ląstelės. Jei mielių kolonijos koduoja priešlaikinį baigties kodoną *ADE1* arba *ADE2* genuose, mielių kolonijų spalva pasikeičia (iš raudonos į baltą), kai formuojasi baltymo agregatai (1.1 pav. B) (Lemarre ir kt., 2020).

Fenotipinis kolonijų pokytis aiškinamas tuo, kad *ADE1* geno mutacija lemia SAICAR sintazės inaktyvinimą. Dėl SAICAR inaktyvinimo, ląstelė ima kaupti amino imidazolo ribotidą (AIR) (EC 6.3.3.1) (angl. *aminoimidazole ribotide*). Jis polimerizuojasi ir generuoja raudoną pigmentą, kuris ir nudažo ląsteles, neturinčias prionų, raudonai (1.2 pav. C).

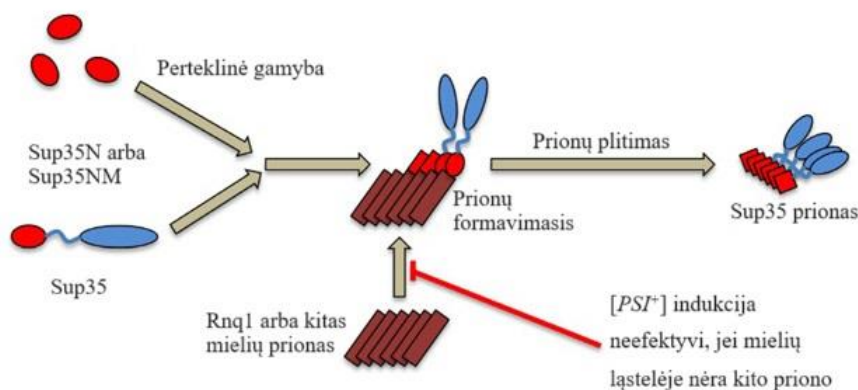


1.2 pav. Skirtingi mielių prionų plitimo mastai. Vaizduojamos skirtingos prionizacijos mielių kolonijos ant mitybinės terpės (adaptuota pagal Lemarre ir kt., 2020).

Jei Sup35 baltymas yra prionizuotoje formoje – eRF3 yra dalinai neaktyvus ir priešlaikinis baigties kodonas yra nenuskaitomas. Tai lemia funkcionalios SAICAR sintazės sintezę, kuri sustabdo raudono pigmento kaupimąsi, todėl ląstelės, turinčios prionų, ima formuoti baltos spalvos kolonijas (1.2 pav. C) (Nevzglyadova ir kt., 2011).

1.3.2. $[PSI^+]$ priono indukcija

Spontaniškas *de novo* $[PSI^+]$ formavimasis yra labai retas – dažnis svyruoja 10^{-6} – 10^{-8} intervale, priklausomai nuo kamieno ir prionų struktūros. Tačiau dėl per didelės Sup35 baltymo arba PrD sintezės, $[PSI^+]$ formavimosi dažnis dar gali padidėti iki 10^{-1} (Chernoff ir kt., 2021). Dažniausiai priono formavimąsi skatina kito prioninio baltymo (turingo asparaginu ir glutaminu) buvimas tose pačiose ląstelėse. $[PSI^+]$ priono atveju, spontaniškam priono formavimuisi yra svarbus Rnq1 baltymas, kuris taip pat vadinamas $[PIN^+]$ arba $[RNQ^+]$. $[PIN^+]$ priono vaidmuo $[PSI^+]$ indukcijoje vaizduojamas 1.3 pav.



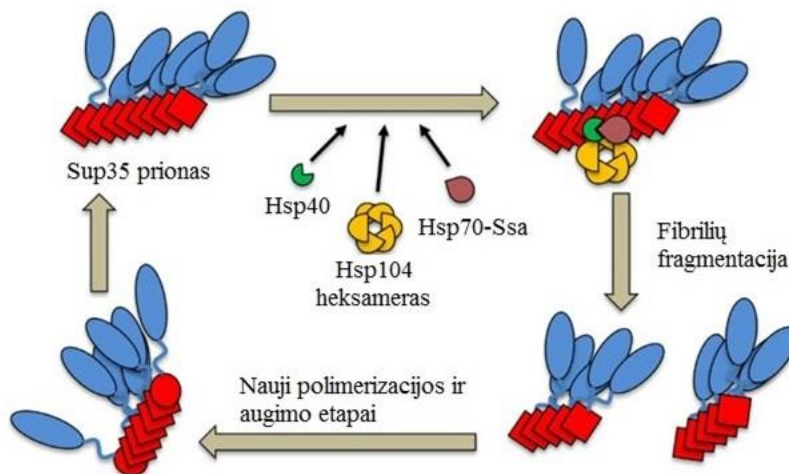
1.3 pav. $[PSI^+]$ formavimasis mielių ląstelėse bei kitų baltymų atliekami vaidmenys šiame procese. Vaizduojami veiksniai, skatinantys $[PSI^+]$ formavimąsi dėl Sup35 PrD konstrukto sintezės. Kiti mielių prionai (pavyzdžiui, Rnq1 prionas ($[PIN^+]$)) procese dalyvauja kaip prionų branduoliai arba „sėklos“ (angl. *nucleation center*) (adaptuota pagal Chernoff ir kt., 2021).

Chernoff ir kt. (2021) mini, jog net kelių skirtingų autorių tyrimų, atliktų skirtingais metais, metu nustatyta, jog Rnq1 priono polimerai sudaro pirminį pagrindą Sup35 amiloido formavimuisi. Tai tik įrodo, kokį svarbų vaidmenį atlieka kitų mielių prionų buvimas, o ypač Rnq1, $[PSI^+]$ formavimuisi ir kaip tai pagreitina visą Sup35 priono plitimo procesą.

1.3.3. Šaperoninių baltymų vaidmuo prionų plitime

Egzistuoja tokie ląstelių gynybos mechanizmai kaip šaperono baltymai ir ubikvitino-proteosomų sistema. Tokie mechanizmai yra reikalingi ląstelių apsaugai nuo streso pažeistų baltymų agregacijos, amiloido agregatų ir su stresu susijusių baltymų atpažinimui bei yra pagrindiniai prionų susidarymo ir dauginimosi mielėse modulatoriai. Tas pats šaperoninis mechanizmas, kuris yra

susijęs su streso pažeistų baltymų skaidymu, yra susijęs ir su mielių prionų dauginimu bei paveldėjimu (Derkatch ir kt., 1997; Chernova ir kt., 2014, 2017). Ryšys tarp šaperonų ir prionų pirmą kartą buvo nustatytas naudojant [*PSI*⁺] prioną kaip modelį. Šaperonas suskaido dideles fibriles į mažus oligomeras, kurie inicijuoja naują prionų replikacijos ciklą (*1.4 pav.*). Pirmas atrastas šio mechanizmo komponentas yra šaperonas Hsp104 (Chernoff ir kt., 1995). Hsp104 yra būtinas daugumai mielių prionų (Chernova ir kt., 2017; Matveenko ir kt., 2018). Mechanizme taip pat dalyvauja Hsp70 šeimos Ssa nariai (Jung ir kt., 2000; Jones ir kt., 2004) ir Hsp40 šeimos ko-šaperonai (dar žinomi kaip J baltymai) (Sporn ir Hines, 2015).



1.4 pav. Šaperonų vaidmuo [*PSI*⁺] priono plitime. Amiloidinių fibrilių fragmentacija sukuria naujas oligomeras, „sėklas“ tolesniems polimerizacijos etapams. Šaperoninį mechanizmą sudaro Hsp40, Hsp104 bei Hsp70-Ssa baltymai. Raudoni kvadratai vaizduoja pakitusį Sup35 baltymo N domeną, raudoni apskritimai vaizduoja natyvų Sup35 baltymo N domeną, o mėlynos elipsės – vaizduoja Sup35 baltymo C domeną (adaptuota pagal Chernoff ir kt., 2021).

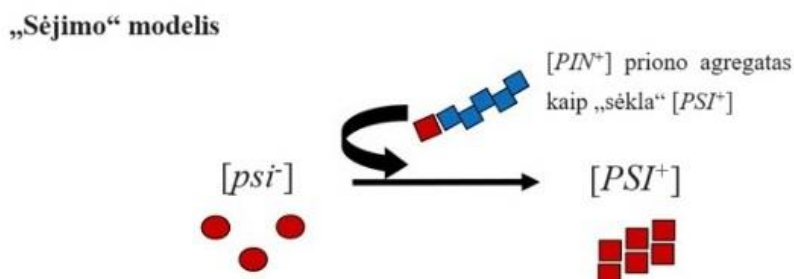
Dabartiniame [*PSI*⁺] prionų plitimo modelyje Hsp70/40 kompleksas jungiasi prie amiloidinių fibrilių ir įtraukia Hsp104 (Winkler ir kt., 2012). Nors Hsp104 reikalingas prionams plisti, per didelę Hsp104 gamybą destabilizuoja arba eliminuoja kai kuriuos mielių prionus. Galimai šis antiprioninis poveikis atsiranda dėl to, kad tiesioginis Hsp104 prisijungimas prie amiloidinių fibrilių (be Hsp70-Ssa) ne tik nesuskaido fibrilių, bet ir stabdo prionų plitimą (Winkler ir kt., 2012).

1.3.4. [*PIN*⁺] prionas

Atradus [*PIN*⁺], buvo nustatyta, kad jis sustiprina [*PSI*⁺] atsiradimą ir taip pat turi prioninių baltymų savybių (Derkatch ir kt., 1997, 2000), o vėliau dar buvo parodyta, kad tai Rnq1 baltymo prioninė forma (Derkatch ir kt., 2001). Tai, kad [*PIN*⁺] yra prionas, grindžiama tuo, kad yra paveldimas ne Mendeliniu būdu (kaip ir [*PSI*⁺]), priklauso nuo *HSP104* geno koduojamo baltymo, gali būti eliminuojamas terpėje esant nedideliems kiekiams guanidino hidroklorido (GuHCl) bei gali pakartotinai atsirasti išgydytose ląstelėse (Derkatch ir kt., 2000).

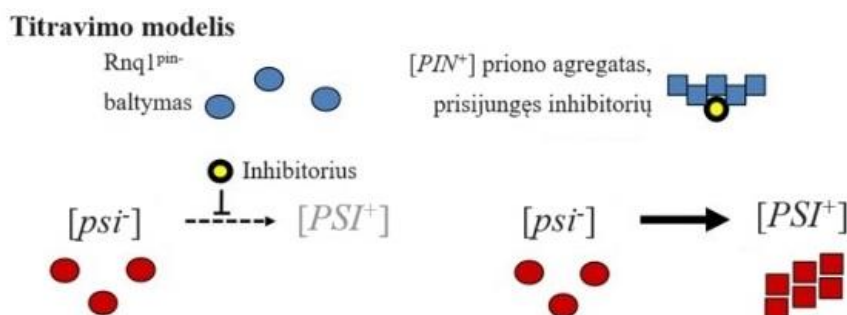
Yra nustatyti 2 modeliai (1.5, 1.6 pav.), vaizduojantys, kaip $[PIN^+]$ gali indukuoti $[PSI^+]$ susiformavimą ląstelėje (Derkatch ir kt., 2001):

1. „Sėjimo“ (angl. *seeding*) modelis (1.5 pav.) – $[PIN^+]$ agregatai sudaro lizdus (angl. *nidus*), prie kurių prisijungę normalios būsenos Sup35 baltymai, gali pakeisti savo konformaciją į prioninę. Prionizuotas Sup35 baltymas toliau sudaro agregatus.



1.5 pav. $[PIN^+]$ veikimo mechanizmo „sėjimo“ (angl. *seeding*) modelis. Normalioje būsenoje Sup35 baltymas yra tirpus (raudoni apskritimai, kairėje), o $[PIN^+]$ formuojantys baltymai – netirpūs, agreguotoje formoje (mėlyni keturkampiai, viršuje). Prie $[PIN^+]$ agregatų gali jungtis tirpus Sup35 baltymas. Dėl šios sąveikos pakinta Sup35 konformacija (raudonas keturkampis, viršuje). Pakitusios konformacijos Sup35 geba prisijungti naujus, natyvios formos Sup35 baltymus, keisti jų konformaciją ir taip toliau agreguoti (raudoni keturkampiai, dešinėje) (adaptuota pagal Liebman ir Chernoff, 2012).

2. **Titravimo modelis** (1.6 pav.) – egzistuoja tokie baltymai (pavyzdžiui, šaperonai), kurie paprastai inhibuoja *de novo* prionų agregaciją. Dėl šio inhibitoriaus ląstelėje nesusidaro $[PSI^+]$ formos agregatai. Tačiau, jei ląstelėje yra $[PIN^+]$ priono agregatų, jie prisijungdami inhibitorių leidžia $[psi^-]$ baltymo formai keisti konformaciją į $[PSI^+]$.



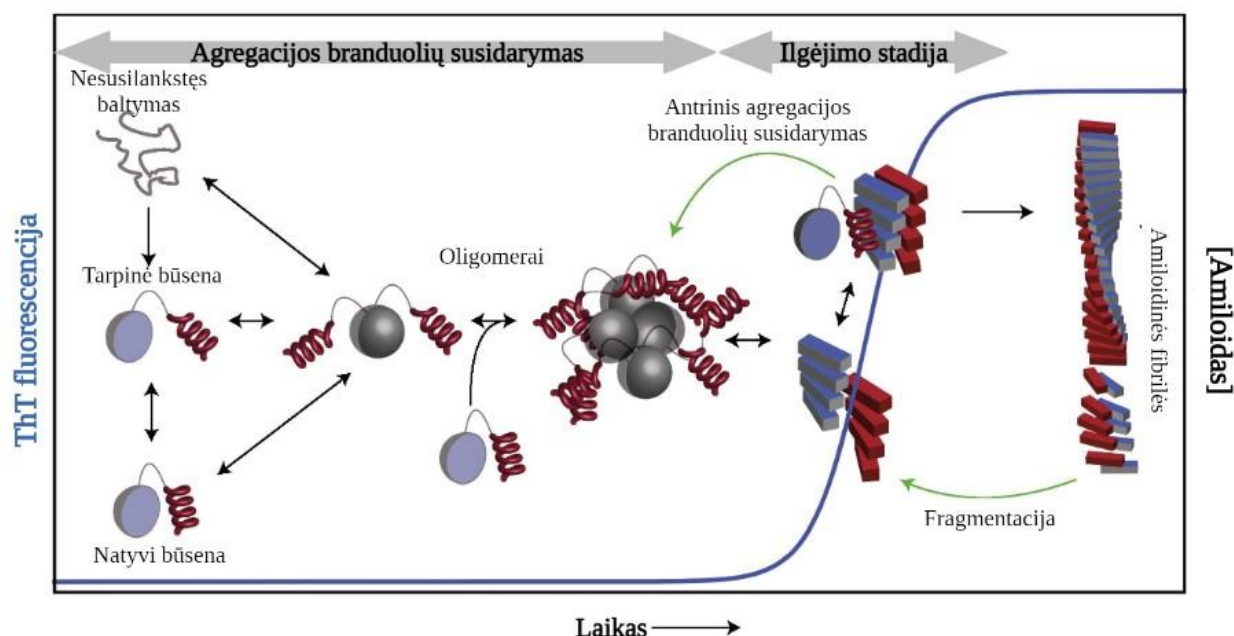
1.6 pav. $[PIN^+]$ veikimo mechanizmo titravimo modelis. Ląstelėje natyvios formos Rnq1 baltymai (mėlyni apskritimai, viršuje kairėje), negali prisijungti inhibitoriaus (geltonas apskritimas, kairėje). Dėl šios priežasties inhibitorius geba stabdyti $[psi^-]$ (raudoni apskritimai, kairėje) konformacinius pokyčius, todėl Sup35 baltymas išlieka natyvios formos. Ląstelėje egzistuojant $[PIN^+]$ priono agregatams (mėlyni keturkampiai, viršuje dešinėje), jie gali prisijungti inhibitorių (geltonas apskritimas, dešinėje), todėl $[psi^-]$ formos baltymas (raudoni apskritimai, dešinėje) keičia savo konformaciją ir tampa $[PSI^+]$ (raudoni keturkampiai, dešinėje) (adaptuota pagal Liebman ir Chernoff, 2012).

Svarbu pabrėžti, kad $[PIN^+]$ yra būtinas $[PSI^+]$ atsiradimui, bet nėra reikalingas šio priono plitimui ląstelėje. Tai reiškia, kad $[PIN^+]$ atlieka svarbų vaidmenį Sup35 konformacijos keitime, tačiau kiti mechanizmai (aptarta [1.3.3. skyriuje](#)) užtikrina jau susidariusio $[PSI^+]$ priono plitimą.

1.4. Amiloidinių baltymų formavimasis

Dabar žinoma apie 50 skirtingų baltymų ir peptidų, kurie geba susirinkti į amiloidines fibriles ir kurie yra susiję su įvairiomis žmonių neurodegeneracinėmis ligomis, dar skirstomas į amiloidozes ir prionines ligas (Benson ir kt., 2020). Amiloidinių baltymų formavimasis yra daugiapakopis procesas. Mechanizmas bendrai apibrėžiamas kaip monomerinių baltymų pirmtakų agregavimas sudarant fibriles (Ferrone, 1999; Knowles ir kt., 2014). Monomeriniai pirmtakai gali būti nesusilankstę arba iš dalies sulankstyti. Retais atvejais agregaciją gali inicijuoti pats natyvus baltymas (Sicorello ir kt., 2009).

Pirmasis fibrilių formavimosi etapas apima oligomerų susidarymą, o toliau jie gali jungtis tarpusavyje, kad susidarytų aukštesnės eilės rūšys, kurios gali būti esminiai amiloidinių fibrilių pirmtakai arba priešingai, neleisti toliau formuotis fibrilei (Ferrone, 1999). Mechanizmo schema pateikta 1.7 pav.



1.7 pav. Amiloidinių baltymų formavimosi mechanizmai. Schemoje pavaizduoti galimi amiloido susidarymo mechanizmai pirminiais (juodos rodyklės) arba antriniais (žalios rodyklės) keliais. Amiloido surinkimas prasideda nuo monomerinio pirmtako, kuris gali būti nesusilankstęs, tarpinės būsenos arba natyvios būsenos (kairėje). Dinaminė pusiausvyra tarp šių trijų būsenų yra atsakinga už amiloidinį potencialą turinčių rūšių generavimą lėtos agregacijos branduolių susidarymo stadijos metu. Susiformavus agregacijos branduoliui, prasideda greita fibrilinių agregatų augimo stadija (ilgėjimo stadija). Antriniai mechanizmai, tokie kaip antrinis branduolių susidarymas jau susiformavusių fibrilių (arba agregatų) paviršiuje arba fibrilių suskaidymas, taip pat yra esminiai veiksniai, lemiantys amiloido surinkimo likimą. Tioflavinas T (ThT) jungiasi su kryžminiais β agregatais, jo fluorescencija dažniausiai naudojama reakcijos eigai stebėti (adaptuota pagal Karamanos ir kt., 2015).

Fibrilių neformuojantys oligomerai taip pat gali būti citotoksiški ir susiję su liga. Oligomerizacijos proceso metu susidaro agregacijos branduolys, kuris kinetiškai yra apibrėžiamas kaip nestabiliausia (didžiausios energijos) rūšis, susidaranti prieš ilgėjimo stadiją, kurios metu vyksta polimerizacija į amiloidines fibriles. Agregacijos branduolio susidarymo tikimybė dalinai nulemia

amiloido susidarymo lag fazės ilgį (1.7 pav. „Agregacijos branduolių susidarymas“) ir galbūt ligos pradžios laiką (Iadanza ir kt., 2018).

Savaiminio fibrilių formavimosi metu kiekvienas baltymo pirmtakas patiria struktūrinę transformaciją, kad susidarytų β -klostėmis turtinga antrinė struktūra. Gali įvykti fragmentacija, kurios metu susiformavusios kryžminės β struktūros fibrilės gali suskilti, sudarydamos naujus fibrilių galus, prie kurių gali jungtis monomerai. Tai sutrumpina lag fazės trukmę ir sukelia eksponentinį fibrilių augimą (1.7 pav. „Ilgėjimo stadija“) (Meisl ir kt., 2016). Toks procesas kaip antrinis branduolių susidarymas taip pat padidina fibrilių susidarymo greitį. Šio proceso metu oligomerų susidarymas katalizuojamas jau susiformavusios fibrilės paviršiuje (Ferrone, 1999; Linse, 2017). Daugeliu atvejų amiloidinių fibrilių kinetika matuojama *in vitro* naudojant amiloidofilinio dažiklio tioflavino T (ThT) fluorescencijos intensyvumą, darant prielaidą, kad santykinai mažesnis fluorescencijos intensyvumas koreliuoja su mažiau susidariusių fibrilių (LeVine, 1993; Matos ir kt., 2017).

Amiloidinės fibrilės gali toliau agreguotis sudarydamos plokšteles, kurios yra fiziškai didelės ir dėl savo dydžio gali sutrikdyti organų veiklą. Mažesnės amiloidinės fibrilės gali būti įtraukiamos į ląsteles endocitozės būdu, tačiau tai gali būti sutrikdyta užkertant kelią prisijungimui prie tam tikrų ląstelės paviršiaus receptorių, tokių kaip limfocitų-aktyvinimo genas 3 (LAG3) (Mao ir kt., 2017). Endosomose ir lizosomose fibrilės gali išskirti toksiškus oligomeras ir sutrikdyti endosomų ir lizosomų funkcijas bei dinamiką, nes fibrilės yra labai atsparios degradacijai (Jakhria ir kt., 2014; Tipping ir kt., 2015). Fibrilės taip pat gali patekti į tarpląstelinę erdvę po to, kai išsiskiria iš ląstelių, tokiu būdu vis patekdamos į naujas ląsteles, gali platinti ligą. Kitas agregatų poveikis ląstelėse yra endoplazminio tinklo (ET) dinamikos sutrikimas (Bäuerlein ir kt., 2017), reaktyviųjų deguonies rūšių (ROS) išsiskyrimas iš mitochondrijų (Uttara ir kt., 2009) ir stresinių reakcijų indukcija (Olzsha ir kt., 2011).

1.4.1. Modifikuotų peptidų panaudojimas agregacijos slopinimui

Šiuo metu yra ištirtas daugelio mažų molekulių, nuo jonų iki kitų peptidų, poveikis Alzheimerio ligos sukėlėjo amiloido- β ($A\beta$) agregacijai. Nustatyta, kad kai kurie, ypač glicerolio ir metalų katijonai, iš tikrųjų pagreitina agregacijos procesą (McLaurin ir kt., 2000). Kita vertus, monokloniniai antikūnai gali sumažinti su Alzheimerio liga susijusį atminties sutrikimą, nors ir nėra įrodyta, kad jie veikia amiloido plokštelę (Dodart ir kt., 2002). Teigiama, kad taip yra dėl antikūno prisijungimo prie tirpių peptidų. Kadangi manoma, kad citotoksiškumą sukelia oligomerinės rūšys, o ne subrendusios fibrilės, antikūnai gali slopinti oligomerų poveikį, iš tikrųjų nesustabdydami agreguotų plokštelių susidarymo (Lebo, 2008).

Įdomu tai, kad modifikuoti peptidai pasirodė kaip veiksminga priemonė agregacijai slopinti. Įvedus mažus peptidus, kurie pirmiausia agreguojasi su tiksliniu baltymu, galima užkirsti kelią

amiloido susidarymui. Buvo nustatyti A β fragmentai, galintys slopinti natūralią agregaciją. Vienas tokių fragmentų pavyzdžių yra cholil-LVFFA-OH, susintetintas natyviais leucino aminorūgštis pakeičiant aspartato aminorūgštimis. Šis A β fragmentas gali veiksmingai blokuoti amiloido susidarymą ir išlikti stabilus biologinėje aplinkoje (Findeis ir kt., 1999). Tai svarbus veiksnys kuriant slopinamuoju poveikiu pasižymintį peptidą: jis ne tik turi veiksmingai sumažinti agregaciją, bet ir turi būti stabilus ląstelėse, kad turėtų laiko atlikti savo funkciją (Lebo, 2008).

Paprastai hidrofobinės aminorūgščių liekanos yra išsidėsčiusios baltymo šerdyje. Taip pat hidrofobinės sritys linkusios susijungti, kad išvengtų vandeninės aplinkos, o tai skatina tinkamą susilankstymą, tuo pačiu išlaikant tokias sritis atskirtas nuo kitų baltymų. Panašiai yra ir su β -klostėmis – paprastai jos būna atskirtos nuo kitų baltymų, nes yra išsidėsčiusios baltymo struktūros viduje. Priešingu atveju, išorėje esančios β -klostės gali sąveikauti ir sudaryti agregatus. Be to, β -klostės dažnai yra susuktos į β statinės struktūrą, todėl neturi atvirų galų ir negali prisijungti prie kitų peptidų. (Monsellier ir Chiti, 2007). Žinoma, gali būti, kad jei peptidai negalėtų agreguotis, būtų neįmanomos tam tikros gyvybinės funkcijos, pavyzdžiui, gebėjimas sąveikauti su kitais peptidais per glutamino ir asparagino turtingus regionus (Michelitsch ir Weissman, 2000; López de la Paz ir Serrano, 2003).

1.4.2. Agreguotis gebančios baltymų aminorūgščių sekos

Viena iš pagrindinių priežasčių, dėl kurių baltymai turi sukurti specifinę apsaugą nuo amiloidogeninių rūšių, yra ta, kad agregacija yra bendra peptidinių grandinių savybė. Nėra specifinės aminorūgščių sekos, sukeliančios baltymų agregaciją. Atvirkščiai, daug skirtingų ir nesusijusių sekų gali sudaryti agregatus (Monsellier ir Chiti, 2007). Iš pradžių buvo manoma, kad ši savybė aptinkama tik hidrofobiniuose regionuose, tačiau ji pastebėta ir įvairiose hidrofilišiose aminorūgščių sekose (Reches ir kt., 2002). Teigiama, kad svarbiausias polinkio agreguotis veiksnys yra peptido gebėjimas sudaryti β -klostes. Tam tikros aminorūgštys dėl sterinių (angl. *steric*) sąveikų tarp aminorūgšties šoninės ir pagrindinės grandinių yra palankesnės β -klostėms struktūrai (Street ir Mayo, 1999).

Tarp įvairių amiloidogeninių peptidų sekų hidrofobinės sritys išlieka vienos iš svarbiausių ir geriausiai ištirtų. Taip yra todėl, kad Alzheimerio A β peptido amiloidogeninės savybės yra pagrįstos jo dideliu hidrofobiškumu. A β turi net kelis hidrofobinius regionus. Nustatyta, kad baltymo liekanų mutavimas šiuose regionuose į hidrofiliškas aminorūgštis sumažina agregacijos greitį (Wurth ir kt., 2002). Tokios mutacijos taip pat turės įtakos agregacijos termodinamikai, sumažindamos bendrą susidariusio amiloido kiekį (Wetzel, 2006). Manoma, kad A β hidrofobiškumas yra toks svarbus, kad atsitiktinis peptido hidrofobinių sričių mutavimas skirtingomis hidrofobinėmis aminorūgštimis nesutrikdo gebėjimo agreguotis. Nors tai sukels nedidelius kinetikos ir fibrilių struktūros skirtumus, bet kurios hidrofobinės liekanos gali būti pakeistos bet kuria kita, o peptidas vis tiek išlaikys savo

amiloidogenines savybes. Manoma, kad hidrofobiškumas, o ne specifinė aminorūgščių seka, suteikia A β gebėjimą formuoti agregatus (Kim ir Hecht, 2006). Todėl, jei hidrofobiškumas padidėja dėl mutacijos, agregacijos greitis ir reakcijos termodinaminis palankumas taip pat padidės (Wetzel, 2006).

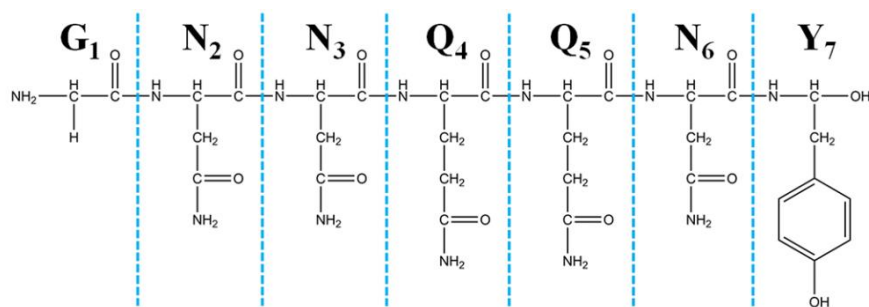
Kiti hidrofobiniai peptidinių grandinių aspektai gali padėti agreguotis net ir hidrofiliniuose peptiduose. Kintamų hidrofobinių ir hidrofilinių liekanų regionai skatina β -klosčių susidarymą, todėl dažnai yra siejami su amiloidogeniniais peptidais (Kim ir Hecht, 2006). Taip pat, amiloido susidarymui yra svarbios ir aromatinių aminorūgščių liekanos. Įrodyta, kad aromatinės žiedo struktūros susikaupia hidrofilinių peptidų DFNKF (žmogaus hormono kalcitonino amiloidogeninis fragmentas) ir GNNQQNY (mielių Sup35 priono fragmentas) agregatuose. Tai suteikia agregatui stabilumo, kas leidžia amiloidui augti (Reches ir kt., 2002; Gsponer ir kt., 2003; Zhang ir kt., 2007).

Buvo nustatyta, kad svarbus hidrofilinės srities tipas, dėl kurio peptidai gali agreguotis, yra didelis glutamino (Gln, Q) ir asparagino (Asn, N) kiekis (Michelitsch ir Weissman, 2000). Regionai, kuriuose gausu Q arba N aminorūgščių, buvo pastebėti keliuose agreguojančiuose baltymuose, įskaitant Huntingtono baltymą ir mielių prioną Sup35, kuris ir buvo tiriamas šiame darbe. Q/N turtingi domenai yra aptinkami daugelio organizmų baltymų sudėtyje (Lebo, 2008). Literatūros šaltiniuose teigiama, kad Q/N turtingi regionai tikriausiai atlieka svarbią ląstelių funkciją, susijusią su baltymų–baltymų sąveika arba savaiminio agregavimo savybėmis. Įdomu tai, kad termofiliniams organizmams šių domenų dažniausiai trūksta, galbūt dėl to, kad aukštesnėje temperatūroje padidėja agregacijos greitis (Lebo, 2008). Prionai susidaro, kai polipeptidas, turintis Q/N turtingą sritį, nėra tinkamai sulankstytas (Michelitsch ir Weissman, 2000). Paprastai ląstelės naudoja šaperonus, kad užtikrintų, jog tokie domenai išliktų nekenksmingi. Pavyzdžiui, šaperono molekulės turi didelę įtaką tam, ar mielių prionas Sup35 tinkamai susilanksto, ar tampa amiloidogeniniu prionu (Krzewska ir Melki, 2006) (plačiau aptarta [1.3.3. skyriuje](#)).

1.4.3. Mielių baltymo Sup35 N domeno aminorūgščių seka GNNQQNY

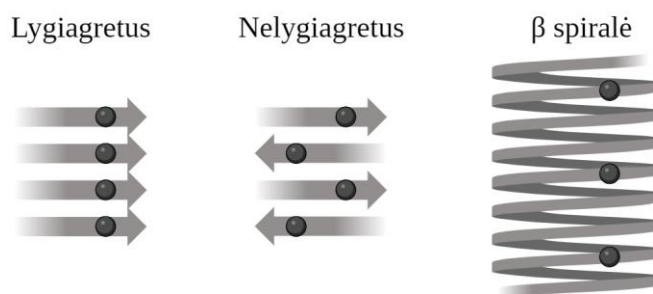
Šiuo metu mielių Sup35 yra vienas labiausiai ištirtų prioninių baltymų modelių (Chen ir kt., 2023). Manoma, kad šio baltymo C domenas yra atsakingas už natyvią biologinę funkciją, o N domenas – atsakingas už prionines savybes (Wickner ir kt., 2015) (plačiau aptarta [1.3.1. skyriuje](#)). Sup35 baltymo agregacijos kinetika formuojant amiloidines fibriles pastaraisiais metais sulaukė daug dėmesio, todėl buvo atlikta įvairių eksperimentų (Shida ir kt., 2020; Nakagawa ir kt., 2022) bei buvo sukurti kompiuteriniai modeliai (Sharma ir kt., 2021) ir simuliacijos (Zhang ir kt., 2016). Daugiausiai mokslininkų dėmesio kreipta į šio baltymo heptapeptidą GNNQQNY (7–13 liekanos) (*1.8 pav.*), kuris yra labai svarbi Sup35 N domeno dalis – ši seka atsakinga už prioninio baltymo susirinkimą į

amiloidines fibriles. Taip pat svarbu paminėti, kad izoliavus šį peptidą, jis vis vien pasižymi visomis amiloidinėmis savybėmis bei agregacijos kinetika kaip ir Sup35 baltymas (Chen ir kt., 2023).



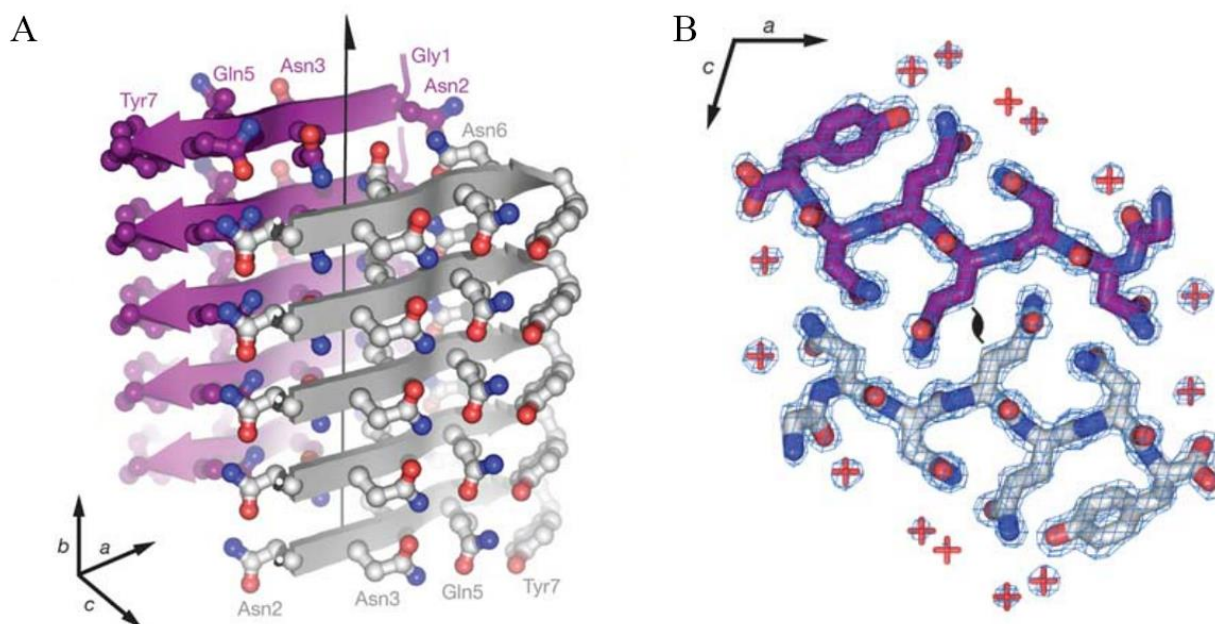
1.8 pav. Prioninio peptido sekos GNNQQNY struktūra (mielių Sup35 baltymo 7–13 liekanos) (Chen ir kt., 2023).

Taigi žinoma, kad peptidas turi didelį agregacijos polinkį, tačiau α -spiralės susidarymas iš tikrųjų yra termodinamiškai stabilesnis nei β -klosčių. Šis energijos barjeras β -klosčių formavimuisi sulėtina agregaciją, o tai paaiškina, kodėl branduolio formavimo „sėkla“ padeda pagreitinti procesą (Lipfert ir kt., 2005). Kai dvi GNNQQNY sekos sąveikauja, jos laikinai sudaro β -klostę. Skirtingi β -klosčių išsidėstymo tipai pavaizduoti 1.9 pav. β -klostė yra linkusi įgauti nelygiagrečią (angl. *antiparallel*) struktūrą, kad susidarytų pradinis dimeras, vien todėl, kad nelygiagrečiai susijungusioms klostėms reikia mažiau energijos nei lygiagrečiai (angl. *parallel*) išsidėčiusioms (Zhang ir kt., 2007). Tačiau susiformavus vienai β -klostei, energijos barjeras kitai – sumažėja. Toliau prie dimero jungiantis trečiam peptidui, pirmenybė teikiama lygiagrečiam išsilygiavimui (Balbirnie ir kt., 2001). Manoma, kad tai nulemia C-galo tirozinai (Tyr, Y) – aromatiniai žiedai kaupiasi vienas ant kito ir stabilizuoja lygiagrečią struktūrą (Balbirnie ir kt., 2001; Gsponer ir kt., 2003). Svarbu paminėti, kad įmanoma toliau formuotis nelygiagrečioms klostėms, tačiau toks išsidėstymas būtų mažiau stabilus, todėl tikėtina, kad susijungusių peptidų struktūra iširtų. Taigi, pradinė GNNQQNY dimerizacija yra pagrįsta nelygiagrečių β -klosčių išsidėstymu, o tolesnė polimerizacija vyksta lygiagrečiai (Balbirnie ir kt., 2001; Z. Zhang ir kt., 2007).



1.9 pav. β -klosčių išsidėstymo tipai. Rodyklės nurodo β juostas, kurios β -klostėse gali išsidėlioti skirtingai – lygiagrečiai (angl. *parallel*) arba nelygiagrečiai (angl. *antiparallel*). Juodi apskritimai vaizduoja tą pačią aminorūgštį skirtingose β juostose (adaptuota pagal Wickner ir kt., 2010).

Susiformavus lygiagrečiai išsidėsčiusiems β -klostėms, jos įgauna bevandenę, sterinio užtrauktuko (angl. *dry, steric zipper*) struktūrą (1.10 pav. B), kuri būdinga GNNQQNY suformuotiems agregatams. Ši struktūra yra neįprasta, nes ji apima aplinką, kurioje nėra vandens molekulių, bet yra sudaryta iš hidrofiliųjų Q ir N liekanų (Nelson ir kt., 2005). Erdvinė užtrauktuko struktūra yra galima dėl peptido aminorūgščių struktūros (Lebo, 2008).



1.10 pav. Mielų baltymo Sup35 GNNQQNY fragmento suformuojamo sterinio užtrauktuko struktūra. A – β -klosčių struktūra, kurioje rodykle pavaizduota pagrindinė grandinė su išsikišusiomis šoninėmis grandinėmis. Šoninės grandinės Asn2, Gln4 ir Asn6 yra nukreiptos į struktūros vidų ir sudaro bevandenę, sterinio užtrauktuko struktūrą. B – sterinio užtrauktuko struktūra iš arčiau. Vaizduojamas dviejų GNNQQNY molekulių išsidėstymas, kurio metu Asn ir Gln aminorūgštys geba komplementariai išsidėstyti ir sudaryti sterinio užtrauktuko struktūrą. Violetine ir pilka spalvomis pažymėti anglies atomai raudonai deguonies atomai, o mėlynai – azoto atomai (adaptuota pagal Nelson ir kt., 2005).

Remiantis kompiuteriniais modeliais, be β -klosčių vandenilinių jungčių, susidaro daug tarppeptidinių ir intrapeptidinių vandenilinių jungčių (Lebo, 2008). Remiantis bendra β -klostės struktūra (1.9 pav. A), 1, 3, 5 ir 7 padėtyse esančios šoninės grandinės yra nutolusios nuo bevandenės sąsajos, o 2, 4 ir 6 padėtyse nukreiptos į ją. Asn6 sudaro vandenilinę jungtį su Gln4, o Asn3 – vandenilinį ryšį su Gln5. Tuo tarpu asparaginai, esantys 2, 3 ir 6 padėtyse, sudaro vandenilinius ryšius su jų atitikmenimis peptiduose, esančiuose aukščiau arba žemiau. Šie ryšiai veiksmingai sumažina vandens, galinčio sąveikauti su hidrofilišiomis liekanomis, kiekį, o tai yra entropiškai palanku, nes iš sąveikos išsiskiria vandens molekulės (Lipfert ir kt., 2005). Be vandens viena β -klostė gali elgtis taip, lyg būtų hidrofobinė, todėl sąveikauja su kita klostė ir taip susidaro bevandenė sąsaja.

Apibendrinus, dviejų peptidų Asn2, Gln4 ir Asn6 aminorūgštys jungiasi priešingomis kryptimis. Ši sąveika išlaiko dvi β -klostes kartu ir padeda peptidams agreguotis (Nelson ir kt., 2005).

1.5. Mutagenezė

Mutagenezė – tai procesas, kurio metu keičiasi organizmo deoksiribonukleorūgštys (DNR) ir dėl to atsiranda genų mutacijos. Mutacija yra nuolatinis ir paveldimas genetinės medžiagos pokytis, dėl kurio gali pakisti baltymų funkcija ir fenotipiniai pokyčiai. DNR mutagenezė vyksta spontaniškai gamtoje arba dėl mutagenų (veiksnių, turinčių polinkį keisti DNR) poveikio. Žinoma, kad mutagenezė yra evoliucijos varomoji jėga, tačiau ji taip pat gali sukelti įvairias ligas, pavyzdžiui vėžį ir paveldimas ligas (Zhang ir Vijg, 2018). Molekulinės biologijos, biochemijos ir biotechnologijų tyrimuose mutagenezė yra plačiai naudojamas metodas. Šis metodas leidžia ištirti baltymų struktūros ir funkcijos ryšį, DNR-baltymų sąveiką ir taip pat leidžia kryptingai pakeisti baltymų funkcijas (Sasnauskas, 2006).

1.5.1. *In vitro* mutagenezė

Molekulinėje biologijoje mutagenezė yra pasitelkiama siekiant sukurti mutuotus genus, baltymus ar organizmus. Mutagenezė skirstoma į dvi grupes: taikiniui specifinė mutagenezė (angl. *site-directed mutagenesis*) bei atsitiktinė mutagenezė (angl. *random-and-extensive mutagenesis*) (Durland ir kt., 2022). Molekuliniai genetiniai metodai, tokie kaip polimerazės grandininė reakcija (PGR), iš esmės pakeitė mutacijų įvedimo ir tyrimo būdus (Zhang ir Vijg, 2018). Taip pat naudojami ir kiti mutagenezės metodai: CRISPR/Cas9 technologija, TALEN (angl. *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) ir cinko pirštų nukleazės (ZFN) (Durland ir kt., 2022).

Pasitelkiant taikiniui specifinę mutagenezę, tikslingą DNR galima modifikuoti tam tikroje nukleotido vietoje, sukuriant norimą aminorūgščių pokytį (Durland ir kt., 2022). Norint šiuo būdu *in vitro* įvesti mutacijas, galima naudoti tiek PGR, tiek ne PGR pagrįstus metodus. Reikšmingas skirtumas tarp šių metodų yra tas, kad ne PGR pagrįsti metodai pasižymi didesniu tikslumu nei PGR pagrįsti metodai, tačiau bus sukuriama tik viena DNR grandinė. Tuo tarpu PGR būdu mutacija norimame DNR fragmente ne tik įvedama, bet ir mutuoti DNR fragmentai pagausinami (Ling ir kt., 1997). Svarbu paminėti, kad taikant PGR ir ne PGR metodus galimos atsitiktinės mutacijos tikslinėje DNR sekoje. Dėl šios priežasties labai svarbu atlikti DNR sekoskaitą, pavyzdžiui Sangerio arba naujos kartos sekoskaitą (Behjati ir Tarpey, 2013).

1.5.2. Mutagenezės pritaikymas mielių baltymo Sup35 tyrimuose

Kaip minėta anksčiau, mutagenezė pasitelkiama įvairiems genams ar jų koduojamiems baltymams tirti. Ne išimtis yra ir mielių Sup35 baltymas. Šis baltymas yra plačiai tiriamas ir literatūros šaltiniuose yra aprašyta įvairių šį baltymą koduojančios DNR sekos modifikacijų. Tyrimų metu siekiama gauti daugiau žinių apie prioninio baltymo agregacijos procesus, jo stabilumą, funkcijas bei gebėjimą plisti. Keli tokie darbai bus aptariami toliau.

Dar 2006 metais buvo atliktas *in silico* tyrimas, kurio metu tirtas ir lygintas laukinio tipo ir kelių mutantinių Sup35 baltymo variantų stabilumas ir dinamika (Zheng ir kt., 2006). Remiantis šiuo tyrimu buvo pasirinktos mutacijos ir šiam darbui, kad tos pačios mutacijos būtų ištirtos *in vivo* sistemoje. Minėto tyrimo objektas buvo Sup35 baltymo GNNQQNY aminorūgščių seka. Siekta išsiaiškinti, kurios GNNQQNY peptido aminorūgštys yra esminės jo agregacijos procese. Tyrimo rezultatai parodė, kad yra trys pagrindinės aminorūgštys – Asn2 (asparaginas, N), Gln4 (glutaminas, Q) ir Asn6 (asparaginas, N). Asn2, Gln4 ir Asn6 jungiasi su tomis pačiomis liekanomis kitame GNNQQNY peptide, sudarydamos sterinę užtrauktuko struktūrą (plačiau aptarta [1.4.3. skyriuje](#)). Nustatyta, kad šių trijų aminorūgščių pakeitimas alaniniais (Ala, A) suardo susidariusią struktūrą, o dėl to susidarę oligomerai tampa nestabilūs.

Mutagenezė taip pat buvo pritaikyta tiriant Sup35 baltymo funkciją ir struktūrą (Fabret ir kt., 2008; Danilov ir kt., 2019). Viename tyrime į tikslinį baltymą buvo įvestos Q33K ir A34K mutacijos (Danilov ir kt., 2019). Šios mutacijos buvo pasirinktos remiantis *in silico* gautais rezultatais. Buvo manoma, kad pasirinktas aminorūgštis pakeitus kitomis, galimai būtų slopinamos Sup35 baltymo amiloidogeninės savybės. Tyrimo rezultatai parodė, kad mutacijų įvedimas nulemia [*PSI*⁺] priono praradimą. Kito tyrimo metu buvo pasirinkta treonino (Thr, D) aminorūgštį, esančią 341 padėtyje, pakeisti alanino (Ala, A) ir aspartato (Asp, D) aminorūgštimis (Fabret ir kt., 2008). Autorių tikslas buvo nustatyti, ar treonino aminorūgštis prisideda prie Sup35 baltymo aktyvumo. Abu mutuoti baltymai (T341A ir T341D) pasižymėjo sumažėjusiu GTPazės aktyvumu ir taip pat sumažėjusia sąveika su Sup45 baltymu. Manoma, kad tokie rezultatai galėtų būti susiję su padidėjusia baltymų transliacija ląstelėse, turinčiose mutuotus baltymus. Taip pat tyrimo metu buvo nustatyta, kad T341 yra susijęs ir su baltymo N bei C domenų tarpusavio sąveika. Taigi, šis tyrimas parodė, kad egzistuoja Sup35 baltymo aminorūgščių liekana, susijusi su Sup35 baltymo transliacijos nutraukimu bei funkcinė sąveika tarp šio baltymo N ir C domenų.

Apibendrinant galima teigti, kad mutagenezės metodo pritaikymas baltymų ir kitų struktūrų tyrimuose suteikia išties daug žinių apie ląstelėse vykstančius procesus. Išsiaiškinę, kaip genetinės mutacijos vyksta molekulinio lygmeniu, mokslininkai gauna žinių apie pagrindines ligų priežastis, biologinės įvairovės dinamiką ir adaptyvius procesus, lemiančius rūšių išlikimą.

1.5.3. Sukurtų mutantinių mielių kamienų panaudojimas tyrimuose

Iki šiol nėra surasti efektyvūs vaistai nuo prionų sukeltamų ligų, o kadangi šios ligos nustatomos dažniausiai jau po mirties, ligų prevencija tampa labai svarbi. Todėl ieškoma junginių, kurie užkirstų kelią [1.1. skyriuje](#) minėtų žinduolių prioninių ligų išsivystymui. Kad būtų veiksmingi, naudojami junginiai turi gebėti slopinti prioninių struktūrų formavimąsi, agregavimąsi, prionų plitimą arba

kuriais būtų galima suardyti oligomerines ir amiloidines struktūras, jei liga jau būtų šiek tiek daugiau pažengusi.

Veiksmingų junginių paieškai yra pasitelkiamos ir molekulinės dinamikos (MD) simuliacijos. Berhanu ir Masunov (2010 m.) atliko tyrimą, kurio metu buvo tirta mielių Sup35 baltymo GNNQQNY seka. Autoriai siekė išsiaiškinti mechanizmus, kuriais mažos molekulės gali slopinti šio peptido agregaciją. Naudojant MD simuliacijas buvo detalai aprašytas procesas, kurio metu mažos molekulės, konkrečiai miricetinas ir kaempferolis (du natūraliai randami polifenoliai), destabilizuoja amiloidų oligomeras. MD simuliacija parodė, kad miricetinas galimai sudaro vandenilinius ryšius su peptido β -kloste. Dėl šios sąveikos miricetinas susilpnina vandenilinius ryšius tarp β -klosčių ir taip išardo išorinį agregato sluoksnį.

Taigi, literatūros šaltiniuose pateikiama, kaip *in vitro* miricetinas galėtų veikti GNNQQNY seką (Berhanu ir Masunov, 2010), tačiau šis mechanizmas dar nebuvo patikrintas *in vivo* sistemoje. Šio darbo metu sukurti mutantiniai kamieniai galėtų būti puiki sistema siekiant patikrinti, ar miricetinas gali veikti amiloidų formavimąsi *in vivo* ir ar toks poveikis priklauso nuo GNNQQNY sekos.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

- **Biolab Zrt., Vengrija:** bakteriologinis peptonas.
- **Bio-Rad, JAV:** agarozė (DNR elektroforezei), TEMED.
- **Carl Roth, Vokietija:** mielių ekstraktas, YNB (be aminorūgščių), sterilūs filtrai (PVDF, porų dydis 0,22 μM), agaras, D(+)-gliukozės monohidratas, DMSO, L-triptofanas, uracilas, ličio acetato dihidratas, vario(II) sulfato pentahidratas, akrilamidas, ampicilinas, APS, bisakrilamidas, glicerolis, glicinas, polietilenglikolis 4000 (PEG 4000), TRIS, natrio laurilsulfatas (NDS), Roti[®]-Blue, metanolis.
- **Honeywell, JAV:** adeninas.
- **Invitrogen by Thermo Fisher Scientific:** laišos spermos DNR, SeeBlue[®] Pre-Stained Protein Standard.
- **Merck, Vokietija:** kalcio chlorido dihidratas, natrio chloridas, natrio hidroksidas.
- **MilliporeSigma, JAV:** L-histidinas.
- **New England Biolabs (NEB), JAV:** rCutSmart[™] Buffer, restrikcijos endonukleazės – SacII, ScaI.
- **Serva, Vokietija:** L-leucinas.
- **Sigma Aldrich, Vokietija:** bromfenolio mėlynasis, EDTA, etidžio bromidas.
- **Thermo Fisher Scientific:** rinkiniai – GeneJET Plasmid Miniprep Kit, GeneJET Gel Extraction Kit, CloneJET PCR Cloning Kit, Phusion[™] Plus PCR Master Mix, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, T4 DNA Ligase, DreamTaq[™] Green PCR Master Mix (2 \times), restrikcijos endonukleazė – FastDigest BamHI, molekulinio dydžio žymuo ir dažas – GeneRuler 1 kb DNA Ladder, TrickTrack DNA Loading Dye (6 \times).

2.1.2. Prietaisai

- Biofotometras (Eppendorf).
- Baltymų elektroforezės aparatas (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad).
- Elektroforezės rezultatų fiksavimo sistema (MiniBIS Pro, DNA Bio-Imaging Systems).
- Elektroninės svarstyklės (Kern ADB).
- Elektros srovės šaltinis (Amersham Biosciences Electrophoresis power supply EPS 601; Consort Electrophoresis power supply 600 V–500 mA E865).
- Gelių vartyklė (Biosan).

- Inkubatorius (Binder).
- Laminarinis boksas (Thermo Fisher Scientific).
- Lašelinis bekiuvetis spektrofotometras (Nanodrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific)
- Magnetinė maišyklė (RH basic 2, IKA).
- pH matuoklis (Mettler Toledo).
- Purtyklė (Linea libera; GFL 1083).
- Stalinė centrifuga (Eppendorf 5424; Fisherbrand; Sigma 3-30K).
- Termocikleris (FlexCycler, AnalyticJena; T100 Thermo Cycler, Bio-Rad).
- Termomaišyklė (TS-100/TS-100C, Biosan).
- UV šviestuvai (Merck).
- Vorteksas (VELP Scientifica).

2.1.3. Kultivavimo terpės ir jų priedai

LB*	Peptonas	10 g/L
	Mielių ekstraktas	5 g/L
	NaCl	5 g/L
	Agaras	20 g/L
LB terpės priedai	Ampicilinas	1 mL/L
YPD*	Gliukozė	20 g/L
	Peptonas	20 g/L
	Mielių ekstraktas	10 g/L
	Agaras	20 g/L
YPD terpės priedai	Adeninas	15 mL/L
SC*	Gliukozė	20 g/L
	YNB	6,7 g/L
	Agaras	15 g/L
SC terpės priedai	Leucino tirpalas	20 mL/L
	Uracilo tirpalas	10 mL/L
	Adenino tirpalas	15 mL/L
	Histidino tirpalas	3 mL/L
	Triptofano tirpalas	10 mL/L

* *Gaminant skystas LB, YPD arba SC terpes, nenaudojamas agaras.*

2.1.4. Tirpalai

Kultivavimo terpėms naudojamų priedų tirpalai:

Leucino tirpalas (100 mM)	L-leucinas	13,1 g/L
Uracilo tirpalas (20 mM)	Uracilas	2,24 g/L
Adenino tirpalas (10 mM)	Adeninas	1,35 g/L
Triptofano tirpalas (40 mM)	L-triptofanas	8,17 g/L
Histidino tirpalas (100 mM)	L-histidinas	20,9 g/L
Ampicilino tirpalas	Ampicilinas	100 g/L

Tirpalai, naudoti transformacijoms:

CaCl ₂ (100 mM)	Kalcio chlorido dihidratas	14,7 g/L
LiOAc/TE pH 7,5**	1 M LiOAc	300 mL/L
	50 mM Tris-HCl	200 mL/L
	0,5 M EDTA	1 mL/L
Mielių transformacijos tirpalas	PEG4000 LiOAc/TE tirpale	267 g/L

DNR elektroforezėje naudojami tirpalai:

50× TAE	Tris	242 g/L
	99 % acto rūgštis	57,1 mL/L
	0,5 M EDTA (pH 8)**	100 mL/L
1× TAE	50× TAE	100 mL/L

NDS-PAGE elektroforezėje naudojami tirpalai ir buferiai:

Akrilamido mišinys	Akrilamidas	290 g/L
	Bisakrilamidas	10 g/L
10× glicino buferis	TRIS	30,3 g/L
	Glicinas	144,2 g/L
	NDS	10 g/L
4× dažas	1 M TRIS pH 6,8**	250 mL/L
	NDS	80 g/L
	Bromo fenolio mėlės	Kruopelė

Tirpalas geno raiškos indukcijai:

100 mM CuSO ₄ tirpalas	Vario(II)-sulfato pentahidratas	24,969 g/L
-----------------------------------	---------------------------------	------------

Visų ląstelės baltymų skyrimui naudojami tirpalai ir buferiai:

2 M LiOAc	Ličio acetato dihidratas	204,04 g/L
0,4 M NaOH	Natrio hidroksidas	16 g/L

** Gaminant skirtingų pH buferius, reikiamam pH pasiekti buvo naudojami 10 % HCl arba 5 M NaOH tirpalai.

2.1.5. Mielių ir bakterijų kamienai, naudoti šiame darbe

Darbe buvo naudojami du kamienai: auktrofinių mutacijų turintis mielių *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamienas (prof. Yury Chernoff dovana) ir bakterijų *E. coli* DH5a kamienas (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Abu kamienai yra laikomi „Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros“ muziejuje.

- Mielių kamieno genotipas:
(MATa *ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 ura3-52 leu2-3,112*) [*psi*][*PIN*⁺].
- Bakterijų kamieno genotipas:
F⁻ φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk^- , mk^+) *phoA supE44 λ*⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*.

2.1.6. Darbe naudotos plazmidės

Šiame darbe buvo naudotos dvi plazmidės: pJET1.2/blunt ir pRSCupSup35-GFP. Šių plazmidžių paskirtis, svarbūs genetiniai elementai ir šaltiniai pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Naudotos plazmidės ir jų aprašymai.

Plazmidė	Paskirtis	Genetiniai elementai	Šaltinis
pJET1.2/blunt	Geno klonavimas	<ul style="list-style-type: none"> • bla (Ap^R) – β-laktamazės genas suteikianti atsparumą ampicilinui. Šis genas reikalingas rekombinantinių <i>E. coli</i> ląstelių atrankai. • eco417IR – letalus genas, koduojantis restriktazę, pagal kurią galima atrinkti teigiamus klonus (jei genas yra įterpiamas į MCS, tuomet šis genas yra pertraukiamas, genas nebus sintetinamas ir ląstelė išgyvena). • P_{lacUV5} – modifikuotas P_{lac} promotorius, reikalingas <i>eco417IR</i> geno ekspresijai. • rep (pMB1) – pMB1 plazmidės replikonas, kuris yra atsakingas už pJET1.2 replikaciją. • MCS – multikloninis saitas, kuriame daug įvairių restriktazių atpažinimo vietų. 	CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific
pRSCupSup35-GFP	Tikslinio baltymo raiška mielių ląstelėse	<ul style="list-style-type: none"> • Amp^R – koduoja geną <i>bla</i>, kurio produktas yra β-laktamazė, suteikianti atsparumą ampicilinui, karbenicilinui ir panašioms antibiotikams. • CUP1 promotorius – tai <i>CUP1</i> geno promotorius, indukuojamas vario jonais. <i>CUP1</i> genas koduoja metalotionino baltymą. 	(Susan Lindquist (Addgene plasmid #1087; http://n2t.net/addgene:1087 ;

		<ul style="list-style-type: none"> • GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas, gautas iš <i>Aequoria victoria</i>. • URA3 – genas, koduojantis baltymą Ura3, kuris dalyvauja <i>de novo</i> pirimidinų biosintezės kelyje. Dėl delecijos baltyme mielių kamienas negeba sintetinti uracilo, todėl vektoriai, kuriuose yra <i>URA3</i> geno kopija be delecijos, kaip kad šiame darbe naudojamas vektorius pRSCup, leidžia mielėms augti terpėje be uracilo, pavyzdžiui, SC^{-ura}. 	RRID:Addgene_1087))
--	--	--	---------------------

2.1.7. Pradmenys

Pradmenys buvo naudojami tiek kuriant mutantinius baltymo variantus, tiek siekiant patvirtinti sekoskaitos būdu, kad mutacijos yra Sup35-GFP baltymo geno sekoje. Mutacijai įvesti pradmenys (2.2 lentelė) buvo kuriami naudojantis „Benchling“ svetaine ir sukurtos sekos buvo išsiųstos sintezei į „NanoDiagnostiką“.

2.2 lentelė. Pradmenys naudoti taikiniui specifinei mutagenizei. Nurodytas kiekvieno naudoto pradmens nukleotidų kiekis jų sekose, pradmenų lydymosi temperatūros (T_m) bei citozino-guanino nukleotidų kiekis procentais (GC).

Pradmuo	Ilgis, nt	T_m , °C	GC, %	Antrinė struktūra
Sup35 N8A tiesioginis	47	70,3	48,94	Vidutinė
Seka	5'-CAGGATCCATGTCGGATTCAAACCAAGGCGCCAATCAGCAAAACTAC-3'			
Sup35 N9A tiesioginis	47	70,3	48,94	Vidutinė
Seka	5'-CAGGATCCATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACGCTCAGCAAAACTAC-3'			
Sup35 Q10A tiesioginis	47	69,7	46,81	Vidutinė
Seka	5'-CAGGATCCATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACAATGCGCAAAACTAC-3'			
Sup35 Q11A tiesioginis	47	69,2	46,81	Vidutinė
Seka	5'-CAGGATCCATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACAATCAGGCAAACTAC-3'			
Sup35 grįžtamasis	35	66,4	51,43	Labai silpna
Seka	5'-CACCGCGGTCATCCTTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'			

2.3 lentelėje pateikti pradmenys, kurie buvo naudoti pJET1.2/blunt plazmidės, turinčios tikslinius genus su mutacijomis N8A, N9A, Q10A, Q11A, sekoskaitai. Visi sekoskaitos mėginiai siųsti nuskaityti DNR sekas į „Azenta Life Sciences“.

2.3 lentelė. Pradmenys, naudoti sekoskaitai. Nurodytas kiekvieno naudoto pradmens nukleotidų kiekis jų sekose, pradmenų lydymosi temperatūros (T_m) bei citozino-guanino nukleotidų kiekis procentais (GC).

Pradmuo	Ilgis, nt	T_m , °C	GC, %	Antrinė struktūra
Sup35 tiesioginis	23	54,7	43,48	Labai silpna
Seka	5'-TCAATCAATCAGGATCCATGTCG-3'			
Sup35 check M183 F	21	52,4	42,86	Jokios
Seka	5'-ACTAAAGAGCCAACAAAGGTC-3'			
Sup35 check C397 F	24	53,9	41,67	Jokios
Seka	5'-GGTGTTAATAAGATGGTTGTCGTC-3'			
Sup35 tag check F	21	51,8	42,86	Jokios
Seka	5'-CAACCGTAAGTCAAAGAAACC-3'			
Sup35 GFP grįžtamasis	19	55,7	57,89	Jokios
Seka	5'-TAGGGCGAATTGGAGCTCC-3'			
Sup35 check M249 R	21	52	42,86	Jokios
Seka	5'-TTCGTCATCCACTTCTTCTTC-3'			

Po bakterijų transformacijos kolonijų PGR atlikti naudoti pradmenys pateikti 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Pradmenys, naudoti mielių ląstelių kolonijų PGR. Nurodytas kiekvieno naudoto pradmens nukleotidų kiekis jų sekose, pradmenų lydymosi temperatūros (T_m) bei citozino-guanino nukleotidų kiekis procentais (GC).

Pradmuo	Ilgis, nt	T_m , °C	GC, %	Antrinė struktūra
Sup35GFP tiesioginis	23	61	43,5	Labai silpna
Seka	5'-TCAATCAATCAGGATCCATGTCG-3'			
Sup35GFP grįžtamasis	19	59	57,9	Jokios
Seka	5'-TAGGGCGAATTGGAGCTCC-3'			

2.2. Metodai

2.2.1. Bakterijų plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinės DNR skyrimui buvo naudojamos *E. coli* DH5 α kamieno ląstelės, turinčios reikalingą plazmidę:

- pRSCupSup35-GFP,
- pJET1.2/bluntSup35N8A-GFP,
- pJET1.2/bluntSup35N9A-GFP,
- pJET1.2/bluntSup35Q10A-GFP,

- pJET1.2/bluntSup35Q11A-GFP,
- pRSCupSup35N8A-GFP,
- pRSCupSup35N9A-GFP,
- pRSCupSup35Q10A-GFP,
- pRSCupSup35Q11A-GFP.

Plazmidėms išskirti naudotas plazmidinės DNR skyrimo rinkinys GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Reikalingos ląstelės užsėjamos ant kietos LB terpės, papildytos ampicilinu (100 µg/mL), (LB^{+amp}) ir auginamos 12–16 val., 37 °C. Toliau nuo kietos LB^{+amp} terpės paimama šiek tiek užaugusių ląstelių kolonijų ir jos suspenduojamos rinkinio resuspensijos buferyje. Tolimesni žingsniai atliekami pagal gamintojo pateiktą protokolą. Gauta plazmidinė DNR analizuojama taikant elektroforezę agarozės gelyje (daugiau [2.2.2. skyriuje](#)).

2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė agarozės gelyje buvo pritaikyta šiame darbe siekiant vizualizuoti ir analizuoti išskirtą plazmidinę DNR, restrikcijos reakcijų bei pagausintų PGR produktus. Pirmiausia paruošiamas gelis. Agarozės koncentracija gelyje renkamasi pagal tikslinių fragmentų dydį, šio darbo atveju naudota 0,8 % agarozės koncentracija. Agarozės milteliai užpilami 1× TAE buferiniu tirpalu ir mišinys kaitinamas, kol agarozė pilnai ištirpsta bei tirpalas tampa skaidrus. Tirpalą atvėsinus iki maždaug 50 °C, jis papildomas etidžio bromido dažu iki galutinės 0,5 µg/mL koncentracijos. Atvėšęs tirpalas supilamas į gelio formelę su šulinėliais ir paliekamas stingti. Geliui sustingus, jis perkeliamas į elektroforezės indą ir užpilamas 1× TAE buferiniu tirpalu taip, kad gelis būtų pilnai apsemtas. Į gelio šulinėlius užnešami DNR ilgio žymuo (GeneRuler 1 kb DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)) bei mėginiai, maišyti su užnešimo dažu TrickTrack DNA Loading Dye (6×) (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezė vykdoma palaikant 90–120 V įtampą 30–50 min. (priklausomai nuo elektroforezės indo dydžio ir naudojamos gelio formelės ilgio). Rezultatai vizualizuojami gelį apšviečiant UV šviesa.

2.2.3. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

Tolimesniems darbams atlikti reikalingi išgryninti tiksliniai fragmentai. Tam naudotas GeneJET Gel Extraction Kit rinkinys (Thermo Fisher Scientific) fragmentų gryninimui iš gelio. Gelį apšvietus UV šviesa, tiksliniai fragmentai išpjaunami skalpeliu ir gryninami pagal naudojamo rinkinio gamintojo pateiktą protokolą.

2.2.4. Taikiniui specifinė mutagenezė

N8A, N9A, Q10A, Q11A mutacijos Sup35 baltyme įvedamos taikiniui specifinės mutagenezės per PGR būdu su specifiniais pradmenimis. Pasirinktoms mutacijoms įvesti, buvo vykdoma viena PGR reakcija (2.5 ir 2.6 lentelės). Specifiniai pradmenys (2.2 lentelė) buvo sukurti naudojantis „Benchling“ svetaine ir užsakomi iš „NanoDiagnostika“. Mutacijoms įvesti pasirinkta naudoti Phusion polimerazę, kuri pasižymi dideliu tikslumu, naudotas Phusion Plus PCR Master Mix rinkinys (Thermo Fisher Scientific).

2.5 lentelė. Mutacijoms įvesti sumaišyti PGR mišiniai. Naudotas didelio tikslumo Phusion DNR polimerazės mišinys (Phusion Plus PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific), DNR matrica – pRSCupSup35-GFP, DMSO (Carl Roth), sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių (Thermo Fisher Scientific) bei pradmenys (pateikti 2.2 lentelėje).

Reagentas	Koncentracija
Phusion Plus PCR Master Mix (2×)	1×
Tiesioginis pradmuo	0,5 μM
Grižtamasis pradmuo	0,5 μM
DNR matrica	0,01–10 ng
DMSO	5 %
Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių	iki 50 μL

Dėl didelio pradmenų ilgio PGR sąlygos buvo pasirinktos pagal gamintojų siūlomą dviejų žingsnių protokolą (2.6 lentelė):

2.6 lentelė. Taikiniui specifinės mutagenezės per PGR sąlygos.

Stadija	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pirminė denatūracija	98	30 s	1
Denatūracija	98	8 s	30
Pradmenų prilydymas / Ilginimas	72	1 min. 8 s	
Galutinis ilginimas	4	5 min.	1

2.2.5. Tikslinio geno įterpimas į klonavimo vektorių

Po 2.2.4. skyriuje aptarto PGR, vykdyto naudojant Phusion polimerazę, tikslinis fragmentas gaunamas bukais galais, todėl pasirinkta šį fragmentą įterpti į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific). Toks klonavimo vektorius yra tinkamas šiuo atveju, nes pagal gamintojo pateikiamą rinkinio protokolą, vektorius yra linijinės formos ir turi bukus fosforilintus galus. Dėl šios priežasties, po PGR gautas pagausintas genas bukais galais gali būti iš karto perkeliamas į šį vektorių. Naudotame CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) pridedama T4 DNR ligazė, kuri ir katalizuoja ligavimo reakciją. Svarbus pJET1.2/blunt klonavimo vektoriaus genetinis elementas yra *eco47IR* genas. Tai yra letalus genas, kurio paskirtis vektoriuje yra patogi rekombinantinę plazmidę turinčių ląstelių atranka po ląstelių transformacijos sukurtu

vektoriumi. Ląstelės turinčios vektorių, tačiau be tikslinio fragmento, kitaip tariant – turinčios „tuščią“ vektorių, neišgyvena ant kietos atrankinės terpės, papildytos ampicilinu (Nawawi ir kt., 2022).

Vektoriaus ir tikslinio fragmento ligavimo reakcija buvo atlikta pagal gamintojo pateikiamą protokolą, išskyrus tai, kad buvo modifikuotas inkubacijos laikas: ligavimo mišinys buvo 1–2 val. inkubuojamas kambario temperatūroje (~22 °C), o po to perkeliamas ~12 val. į 4 °C temperatūrą. Po mišinio inkubacijos, gautas ligavimo mišinys buvo panaudotas *E. coli* DH5α kamieno ląstelių transformacijai cheminiu būdu.

2.2.6. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

Restrikcijos endonukleazės buvo naudotos DNR hidrolizei atlikti su tikslu:

- 1) paruošti pRSCup vektorių lipniais galais, kuris vėliau būtų panaudotas ligavimui su tiksliu fragmentu. Tam naudotos SacII (NEB) ir BamHI (Thermo Fisher Scientific) restrikcijos endonukleazės dvigubai hidrolizei (37 °C, 30 min.–1 val.);
- 2) paruošti tikslius fragmentus prieš ligavimo reakciją su mielių raiškos vektoriumi pRSCup. Šiuo atveju hidrolizuota pJET1.2/blunt plazmidė, turinti tikslinį fragmentą. Šiam tikslui naudotos SacII, ScaI (NEB) ir BamHI (Thermo Fisher Scientific) restrikcijos endonukleazės trigubai hidrolizei (37 °C, 30 min.–1 val.). Triguba hidrolizė buvo vykdyta todėl, kad tikslinio fragmento ir pJET1.2/blunt sekų ilgiai yra labai panašūs – 2785 bp ir 2974 bp atitinkamai, todėl vektoriaus karkasas buvo papildomai hidrolizuojamas ScaI restriktaze;
- 3) patikrinti teigiamus transformantus po ląstelių transformacijos sukurtais vektoriais, turinčiais tikslius fragmentus. Po kolonijų PGR atrinktų teigiamų klonų plazmidinė DNR buvo išskiriama ir hidrolizuojama SacII, ScaI (NEB) ir BamHI (Thermo Fisher Scientific) restrikcijos endonukleazėmis (37 °C, 30 min.–1 val.).

DNR hidrolizės mišinys paruoštas ir sąlygos parinktos remiantis gamintojų pateiktais nurodymais. Atlikus reakciją, gauti mėginiai buvo analizuojami elektroforezės būdu agarozės gelyje (aptarta [2.2.2. skyriuje](#)).

2.2.7. Tikslinio geno klonavimas į mielių raiškos vektorių

Po to, kai pJET1.2/blunt vektorius, turintis tikslinį fragmentą, yra pagausinamas bakterijose, išskiriama plazmidė. Toliau atliekama triguba hidrolizė: vektorius veikiamas SacII, ScaI (NEB) ir BamHI (Thermo Fisher Scientific) restrikcijos endonukleazėmis. Lygiagrečiai paruošiamas ir mielių raiškos vektorius pRSCup. Iš *E. coli* ląstelių išskiriama pRSCupSup35-GFP plazmidė (šios bakterijos saugomos „Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros“ muziejuje), kuri toliau hidrolizuojama

SacII (NEB) ir BamHI (Thermo Fisher Scientific) restrikcijos endonukleazėmis. Visi gauti reakcijos produktai analizuojami taikant elektroforezę agarozės gelyje. Tiksliniai fragmentai ir linijinės formos pRSCup vektorius yra gryninami iš gelio ir toliau naudojami ligavimo reakcijai. Ligavimui naudojama T4 DNR ligazė (Thermo Fisher Scientific). Reakcijos mišinys sumaišomas remiantis gamintojo pateiktu protokolu su inkubacijos modifikacija – reakcijos mišinys inkubuojamas 1–2 val. kambario temperatūroje (~22 °C), o po to perkeliamas į 4 °C, ~12 val. Po ligavimo reakcijos mišinys naudojamas *E. coli* DH5α ląstelių transformacijai.

Vektoriaus ir inserto santykis ligavimo reakcijai pasirenkamas naudojantis NEBioCalculator[®] svetaine. Inserto sekos ilgis yra 2,785 kb, o pRSCup vektoriaus – 5 kb. Pagal šios svetainės rekomendacijas atliekamas 2:1 santykio ligavimas (naudojant 80 ng vektoriaus), tačiau papildomai naudojami 1:1 ir 3:1 santykiai.

2.2.8. Rekombinantinės DNR perkėlimas į kompetentines *E. coli* DH5α ląsteles cheminės transformacijos būdu

Po taikiniui specifinės mutagenozės gavus tikslinius fragmentus su N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijomis ir juos įklonavus į pJET1.2/blunt arba pRSCup vektorius, toliau buvo vykdoma pasirinktų ląstelių transformacija. Šie vektoriai buvo keliami į kompetentines *E. coli* DH5α ląsteles, kurios buvo paruoštos pagal Chen ir kt. (2001) pateiktą protokolą, naudojant cheminės transformacijos metodą. Šio metodo metu 200 µL kompetentinių ląstelių sumaišomos su 5 µL ligavimo mišinio, viskas atliekama šaltai, ledo vonelėje. Toliau kompetentinių ląstelių ir ligato mišinys inkubuojamas 4°C temperatūroje 30 min. Po inkubacijos, ląstelės paveikiamos karščio šoku (42 °C, 2 min.). Šis metodo žingsnis labai svarbus, nes dėl staigaus temperatūros padidėjimo (nuo 4 °C iki 42 °C), ląstelių membranoje susiformuoja poros, per kurias į ląsteles gali patekti norima pernešti DNR. Iš karto po karščio šoko, ląstelės dedamos atgal į ledo vonelę, kur ląstelių membranų poros užsiveria (Panja ir kt., 2006). Toliau ląstelės gaivinamos jas užpilant 200 µL LB terpės ir inkubuojant 37 °C temperatūroje 30 min. Šis etapas svarbus, nes ląstelės, turinčios rekombinantinį vektorių su atsparumo antibiotikui *bla* genu, gaivinimo metu gali susintetinti β-laktamazę, kuri ir suteikia ląstelei atsparumą ampicilinui (Hanahan, 1983). Galiausiai ląstelės išsėjamos ant kietų LB^{+amp} terpių ir inkubuojamos 12–16 val. 37 °C temperatūroje.

2.2.9. Bakterinių kolonijų PGR

Po cheminės ląstelių transformacijos ir inkubacijos 12–16 val. 37 °C temperatūroje ant atrankios LB^{+amp} terpės užaugusios *E. coli* DH5α ląstelių kolonijos toliau analizuojamos kolonijų PGR metodu (Bergkessel ir Guthrie, 2013). Nuo lėkštelės pipetės galu užkabinama pusė tikrinamos kolonijos ir suspenduojama paruoštame 20 µL reakcijos mišinyje (2.7 lentelė). PGR šiuo atveju

naudojamas DreamTaq polimerazės mišinys (DreamTaq Hot Start PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific). Reakcijos mišinys bei PGR sąlygos pateikti 2.7 ir 2.8 lentelėse.

2.7 lentelė. Bakterijų kolonijų PGR atlikti maišomas PGR mišinys. Naudojamas DNR polimerazės DreamTaq Hot Start mišinys (DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)), DNR matrica (pusė tiriamos kolonijos), sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazijų (Thermo Fisher Scientific) ir pradmenys (pateikti 2.2 lentelėje).

Reagentas	Koncentracija
DreamTaq Hot Start Master Mix (2×)	1×
Tiesioginis pradmuo	0,5 μM
Grįžtamasis pradmuo	0,5 μM
DNR matrica	Pusė kolonijos
Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazijų	Iki 20 μL

2.8 lentelė. Vykdomos kolonijų PGR sąlygos.

Stadija	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pirminė denatūracija	95	3 min.	1
Denatūracija	95	30 s	30
Pradmenų prilydymas	72	30 s	
Ilginimas	72	1 min.	
Galutinis ilginimas	72	10 min.	1

Po PGR, mėginiai analizuojami taikant elektroforezę agarozės gelyje. Jei kolonija patvirtinama, kaip turinti rekombinantinę plazmidę, likusi jos dalis persėjama ant naujos kietos LB^{+amp} terpės ir inkubuojama 12–16 val. 37 °C temperatūroje. Iš užaugusios kultūros ląstelių išskiriama plazmidinė DNR (kaip aptarta [2.2.1. skyriuje](#)). Išskirta pDNR toliau darbe buvo veikama restrikcijos endonukleazėmis, sekvenuojama ir naudojama mielių ląstelių transformacijai.

2.2.10. Rekombinantinės DNR perkėlimas į kompetentines *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląsteles cheminės transformacijos būdu

Kompetentinės mielių *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelės ruošiamos ir jų cheminė transformacija atliekama remiantis Aitmanaitė ir kt. (2021). Pirmiausia minėto kamieno ląstelės yra šviežiai atsėjamos ant YPD terpės ir auginamos 3 paras, 30 °C. Toliau 1 ląstelių kolonija persėjama į 5 mL skystos YPAD terpės (YPD terpė, papildyta steriliu 10 mM adenino tirpalu (15 μL/mL)) ir ląstelės auginamos 16–20 val. 30 °C, 130 aps./min. Po auginimo 500 μL kultūros perkeliama į 50 mL skystos YPAD terpės ir auginama 30 °C, 130 aps./min. iki kol pasiekiamas OT₆₀₀ = 0,7. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 5 min., 1000 ×g, kambario temperatūroje. Tuomet ląstelės praplaunamos steriliu dejonizuotu vandeniu ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Galiausiai, ląstelės suspenduojamos 300 μL sterilaus LiOAc/TE tirpalo.

Paruošus kompetentines mielių ląsteles, toliau vykdoma cheminė transformacija. 100 μL ląstelių sumaišoma su 1 μg vektoriaus (skirtingas mutacijas turinčiu arba natyviu pRSCupSup35-

GFP), 20 µL laiššos spermos DNR (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), kuri prieš naudojimą paveikiama 98 °C temperatūra, 10 min., bei su 600 µL transformacijos mišinio. Šis mišinys purtomas, kol tampa homogenišku, o tada inkubuojamas 30 min., 30 °C, 250 aps./min. Po inkubacijos pridama 70 µL DMSO, mišinys išmaišomas ir veikiamas karščiu 15 min., 42 °C, 250 aps./min. Tuomet ląstelės surenkamos centrifuguojant 30 s, 10000 ×g, suspenduojamos 200–300 µL steriliame dejonizuotame vandenyje ir išsėjamos ant kietos SC be uracilo terpės. Mielių ląstelės auginamos 3–5 paras, 30 °C temperatūroje.

2.2.11. Mielių kolonijų PGR

Po cheminės mielių ląstelių transformacijos ir inkubacijos 3–5 paras, 30 °C temperatūroje ant kietos SC be uracilo terpės (SC^{-ura}), užaugusios ląstelės analizuojamos kolonijų PGR metodu (Bergkessel ir Guthrie, 2013). Pipetės galu užkabinama dalis mielių kolonijos nuo lėkštelės ir suspenduojama 20 µL paruošto reakcijos mišinio. Reakcijos mišinys ir PGR sąlygos pateikti 2.9 ir 2.10 lentelėse.

2.9 lentelė. Mielių kolonijų PGR atlikti sumaišomas PGR mišinys. Naudojama Phusion DNR polimerazės (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)), dNTP (Thermo Fisher Scientific), DNR matrica (pusė tiriamos kolonijos), sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių (Thermo Fisher Scientific) ir pradmenys (pateikti 2.4 lentelėje).

Reagentas	Koncentracija
5× Phusion HF buferis	1×
10 mM dNTP	200 µM kiekvieno
Tiesioginis pradmuo	0,5 µM
Grižtamasis pradmuo	0,5 µM
DNR matrica	Pusė kolonijos
Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių	Iki 20 µL

2.10 lentelė. Vykdomos mielių kolonijų PGR sąlygos.

Stadija	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pirminė denatūracija	98	30 s	1
Denatūracija	98	10 s	35
Pradmenų prilydymas	60	45 s	
Ilginimas	72	2 min.	
Galutinis ilginimas	72	5 min.	1

Po atliktos PGR gauti mėginiai analizuojami taikant elektroforezę agarozės gelyje. Teigiami klonai persėjami ant naujos kietos SC^{-ura} terpės.

2.2.12. Tikslinio baltymo sintezės indukcija vario jonais *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno mielių ląstelėse

Darbe kaip mielių raiškos vektorius naudojamas pRSCup, kuriame tikslinis genas, turintis mutaciją arba ne, yra įterptas šalia vario jonais indukuojamo promotoriaus *CUPI* (Thiele, 1988). Dėl šios priežasties tikslinio baltymo indukcija buvo vykdoma į terpę su ląstelėmis pridėdant sterilaus vario sulfato tirpalo iki galutinės 15–100 μM koncentracijos. Mielės *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelės, turinčios pRSCupSup35-GFP, pRSCupSup35N8A-GFP, pRSCupSup35N9A-GFP, pRSCupSup35Q10A-GFP, pRSCupSup35Q11A-GFP plazmidės, buvo auginamos 5 mL skystoje SC^{-ura} terpėje. Taip pat, kaip kontrolė buvo naudojama ne tik mielių ląstelės, turinčios natyvią plazmidę, bet ir ląstelės, neturinčios jokios plazmidės. Mielės be plazmidės buvo auginamos 5 mL skystoje SC⁺ terpėje. Induktorius buvo pridėdamas ląstelėms pasiekus 0,7–0,9 optinį tankį. Baltymo indukcija buvo vykdoma 1–24 val., o indukcijos sąlygos parinktos remiantis Glover ir kt. (1997), Peña ir kt. (1998), Wang (2006), Liu ir kt. (2015).

2.2.13. Visos ląstelės baltymų skyrimas iš mielių šarminės lizės metodu

Užauginus kultūras, buvo paimami mielių ląstelių mėginiai, kurie toliau centrifuguojami 5 min., 1500 ×g, kambario temperatūroje. Ląsteles nucentrifugavus, supernatantas nupilamas, ląstelės perkeliama į ledo vonelę ir suspenduojamos 150 μL šalto, sterilaus 2 M LiOAc tirpale. Šis mišinys inkubuojamas 10 min. ledo vonelėje, tada ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas ir vėl nupilamas, ląstelės perkeliama į ledo vonelę. Mėgintuvėlyje likusios ląstelės suspenduojamos 150 μL šalto 0,4 M NaOH tirpalo ir mišinys vėl inkubuojamas 10 min. Po inkubacijos ląstelės ir vėl centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas. Galiausiai ląstelės suspenduojamos 50 μL NDS-PAGE dažo buferyje ir verdamos 5 min. Gauti mėginiai arba leidžiami į poliakrilamidinį gelį, arba laikomi šaltai (–20 °C). Visų ląstelės baltymų skyrimo sąlygos buvo parinktos pagal Zhang ir kt. (2011).

2.2.14. Mielių ląstelių baltymų analizė elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (NDS-PAGE)

Gauti mėginiai po visų ląstelės baltymų skyrimo šarminės lizės metodu buvo analizuojami taikant elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. 12 % skirstomasis ir koncentruojamasis geliai buvo paruošiami naudojant Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell NDS-PAGE analizės sistemą. Ruoštų gelių sudėtys pateiktos 2.11 lentelėje. Paruošti geliai buvo užpilami Tris-glicino buferiu.

2.11 lentelė. NDS-PAGE naudojamų skirstomojo ir koncentruojamojo gelių sudėtys.

Reagentai	Medžiagos, mL	
	12 % skirstomasis gelis (5 mL)	Koncentruojamasis gelis (2 mL)
Dejonizuotas vanduo	1,600	1,400
30 % akrilamidas*	2,000	0,330
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,300	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	0,250
10 % SDS	0,050	0,020
10 % APS	0,050	0,020
TEMED	0,002	0,002

* Akrilamido tirpalas: 30 % akrilamido ir bisakrilamido tirpalas, sumaišytas santykiu 29:1 atitinkamai.

Į gelių šulinėlius buvo užnešama po 15 µL mėginio ir 5 µL baltymų molekulinio dydžio žymens (SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard, 3 to 198 kDa, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). NDS-PAGE metodu atliktai baltymų analizei sąlygos buvo pasirinktos remiantis Bio-Rad gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Elektroforezė vykdyta palaikant 10 mA, 180 V, 10 W sąlygas, kol mėginiuose esantis dažas pasiekia skirstomąjį gelį. Dažui pasiekus skirstomąjį gelį, elektros srovės stipris padidinamas iki 20 mA, o kitos sąlygos paliekamos tokios pačios. Baltymams pasiskirsčius, geliai buvo vizualizuojami juos dažant Roti®-Blue (Carl Roth) baltymų dažymo tirpalu pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

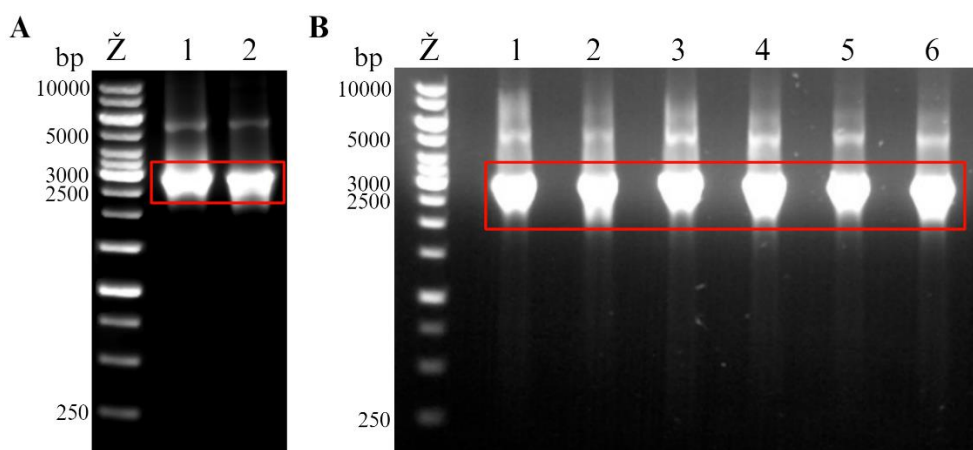
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantinių variantų kūrimas ir klonavimas

3.1.1. Vietai specifinė mutagenezė

Mielių baltymo Sup35 GNNQQNY sekoje pasirinkta atlikti N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijas remiantis *in silico* atliktu tyrimu (Zheng ir kt., 2006). Šį tyrimą atlikusi komanda teigia, kad įvedus mutacijas Sup35 baltymo 8, 10 arba 12 aminorūgščių pozicijose, turėtų būti suardyta sterinio užtrauktuko struktūra, kuri svarbi priono agregavimosi procesui (plačiau aptarta [1.4.3. skyriuje](#)). Šiam darbui *in vivo* sistemoje pasirinkta pakeisti 4 aminorūgštis – N8A, N9A, Q10A ir Q11A, iš kurių 2 yra svarbios sterinio užtrauktuko struktūros susidarymui, t.y. 8 ir 10 pozicijose esantys argininas ir glutaminas atitinkamai. Asparagino ir glutamino aminorūgštys keistos alaninu, nes ši aminorūgštis dėl savo biofizinių ir techninių savybių dominuoja mutagenezės tyrimuose (Bromberg ir Rost, 2008).

Pasirinktos 4 mutacijos įvestos taikiniui specifinės mutagenezės per PGR metodu. Mutagenezei naudoti sukurti mutantiniai pradmenys ([2.2 lentelė](#)). Mutantiniai pradmenys išsidėsto gausinamo geno šonuose ir apima restrikcijos endonukleazių BamHI ir SacII hidrolizavimo vietas. Tai svarbu tolesniems darbo etapams, kuomet bus atliekamas tikslinių fragmentų lipnių galų ligavimas su mielių raiškos vektoriumi pRSCup. Svarbu paminėti, kad šiam darbui sukurti pradmenys ([2.2 lentelė](#)) gali sudaryti antrines struktūras. Norint sėkmingai atlikti taikiniui specifinę mutagenezę per PGR, būtina užtikrinti, kad pradmenys nesudarytų antrinių struktūrų. Literatūros šaltiniuose teigiama, kad DMSO yra tinkamas, norint pagerinti PGR išeią, nes geba slopinti matricinės DNR arba pradmenų antrinių struktūrų susidarymą (Winship, 1989; Kang ir kt., 2005). Gauti PGR produktai buvo analizuojami taikant DNR elektroforezę agarozės gelyje ([3.1 pav.](#)).



3.1 pav. PGR, kurios metu į baltymo Sup35 GNNQQNY seką buvo įvedama N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijos, mėginių analizė DNR elektroforeze agarozės gelyje. A) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1 – PGR mėginys, kuriame naudoti pradmenys, turintys įvesti N8A mutaciją, į mėginio mišinį nebuvo papildomai pridėta DMSO, 2 – PGR mėginys, kuriame naudoti pradmenys, turintys įvesti N8A

mutaciją, į mėginio mišinį buvo papildomai pridėta DMSO (5 %). B) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1, 3, 5 – PGR mėginiai, kuriuose naudoti pradmenys, turintys įvesti N9A, Q10A, Q11A mutacijas atitinkamai, į mėginių mišinius nebuvo papildomai pridėta DMSO, 2, 4, 6 – PGR mėginiai, kuriuose naudoti pradmenys, turintys įvesti N9A, Q10A, Q11A mutacijas atitinkamai, į mėginių mišinius buvo papildomai pridėta DMSO (5 %). Raudonais stačiakampiais pažymėti tiksliniai fragmentai, išsidėstantys tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių, kas atitinka teorinį tikslinio fragmento dydį – 2,785 kb.

Pagal gautus rezultatus (3.1 pav.) matyti, kad į reakcijos mišinį tiek papildomai pridedant DMSO (A 2 stulpelis; B 2, 4, 6 stulpeliai), tiek nepridedant (A 1 stulpelis; B 1, 3, 5 stulpeliai), tikslinio geno pagausinimas pavyko. Pagausinti tiksliniai fragmentai išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių, o tai atitinka ir teorinį tikslinio geno dydį (2,785 kb) (Addgene: pRSCupSup35GFP; Uckert ir kt., 2000). Kadangi PGR pavyko ir į mišinį papildomai nepridėjus DMSO, tolesniuose darbuose buvo naudojami PGR produktai pagausinti be DMSO. Fragmentai, išsidėstę ties ~5 kb, galėtų būti pagausintas pRSCup vektorius, nes kaip matricinė DNR šios reakcijos metu buvo naudojamas natyvus pRSCupSup35-GFP vektorius.

Taigi, remiantis DNR elektroforezės agarozės gelyje rezultatais galima teigti, kad tikslinių genų, galimai turinčių norėtas įvesti mutacijas, pagausinimas pavyko. Visi gauti tiksliniai fragmentai, kurių pagausinimui reakcijos mišinyje nebuvo pridėto DMSO, buvo gryninami iš gelio ir naudojami ligavimo reakcijai su klonavimo vektoriumi pJET1.2/blunt. Gautos plazmidės su galimai įvestomis skirtingomis N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijomis toliau buvo naudojamos *E. coli* DH5α ląstelių transformacijai. Tolimesniuose darbo etapuose, siekiant įsitikinti, kad kiekvienas iš pagausintų fragmentų turi tikslinę mutaciją, mėginiai buvo išsiųsti DNR sekoskaitai, kurios rezultatai bus pateikiami [3.1.4. skyriuje](#).

3.1.2. Tikslinių genų įterpimas į klonavimo vektorių ir perkėlimas į *E. coli* DH5α kamieno ląsteles

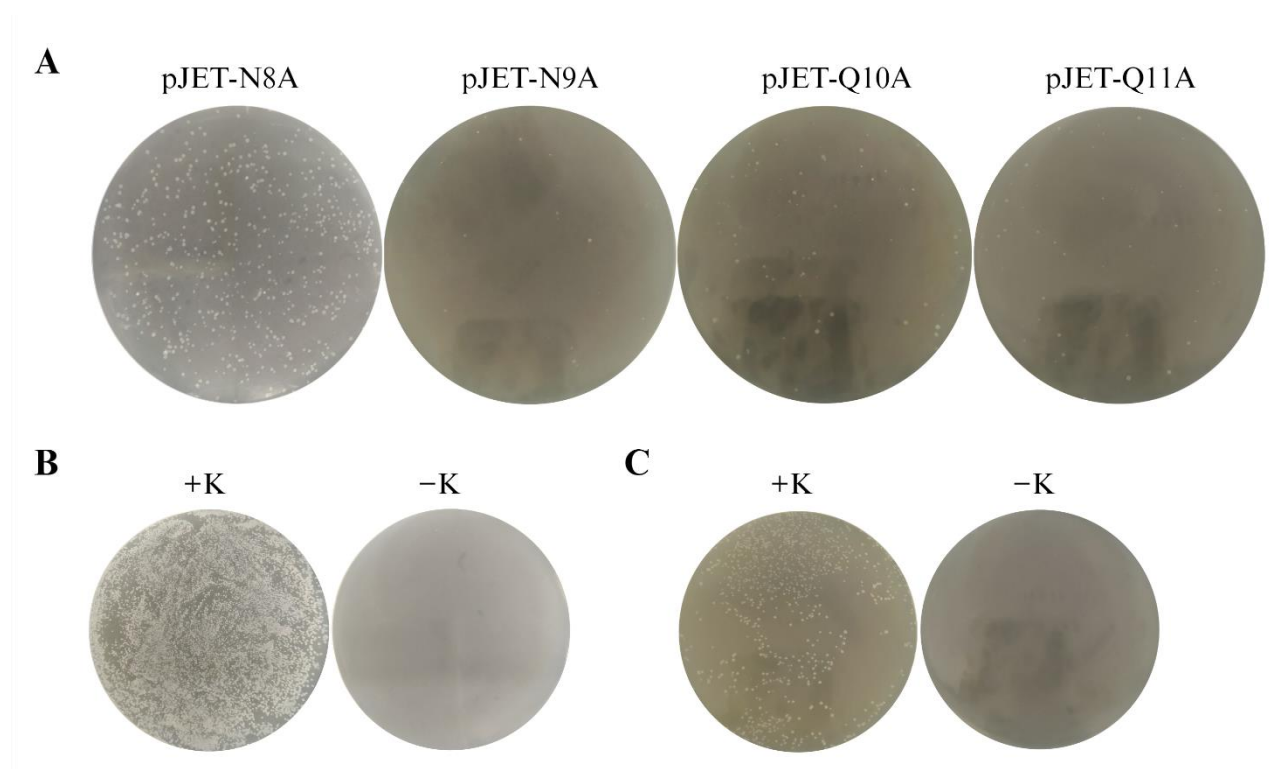
Atlikus taikiniui specifinę mutagenę per PGR gauti produktai Sup35N8A-GFP, Sup35N9A-GFP, Sup35Q10A-GFP, Sup35Q11A-GFP turi bukus galus, nes jų pagausinimui buvo naudojama dideliu tikslumu pasižyminti Phusion polimerazė (plačiau aptarta [2.2.5 skyriuje](#)). Tolimesniuose darbo etapuose buvo naudojamas mielių raiškos pRSCup vektorius, kuris yra šaudyklinis. Šaudykliniai vektoriai pasižymi tuo, kad gali būti naudojami skirtingų tipų ląstelėse, kaip ir šiuo atveju – bakterijose *E. coli* ir mielėse *S. cerevisiae* (Scott ir kt., 2021). Šiame darbe naudojama SacII restrikcijos endonukleazė, kuri pasižymi savybe hidrolizuoti DNR seką tik atpažinusi dvi sekos kopijas. Dėl šios restriktažės savybės iškyla problema, jog PGR produkto ligavimas su vektoriumi gali būti neefektyvus, nes būtų sunku išlaikyti tinkamą tikslinio fragmento ir vektoriaus santykį. Taigi pirmiausia perkeliant tikslinius fragmentus į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt ir toliau sukurtus

vektorius paveikiant restrikcijos endonukleazėmis, galima užtikrinti 5' ir 3' lipnius galus turinčių sekų buvimą.

E. coli DH5a ląstelių cheminei transformacijai buvo naudojami po ligavimo reakcijos su pJET1.2/blunt sukurti klonavimo vektoriai:

- pJET1.2/bluntSup35N8A-GFP (toliau pJET-N8A),
- pJET1.2/bluntSup35N9A-GFP (toliau pJET-N9A),
- pJET1.2/bluntSup35Q10A-GFP (toliau pJET-Q10A),
- pJET1.2/bluntSup35Q11A-GFP (toliau pJET-Q11A).

Ląstelės buvo kultivuojamos ant atrankios LB^{+amp} terpės, užaugusių transformantų kolonijų kiekis pateiktas 3.2 pav.

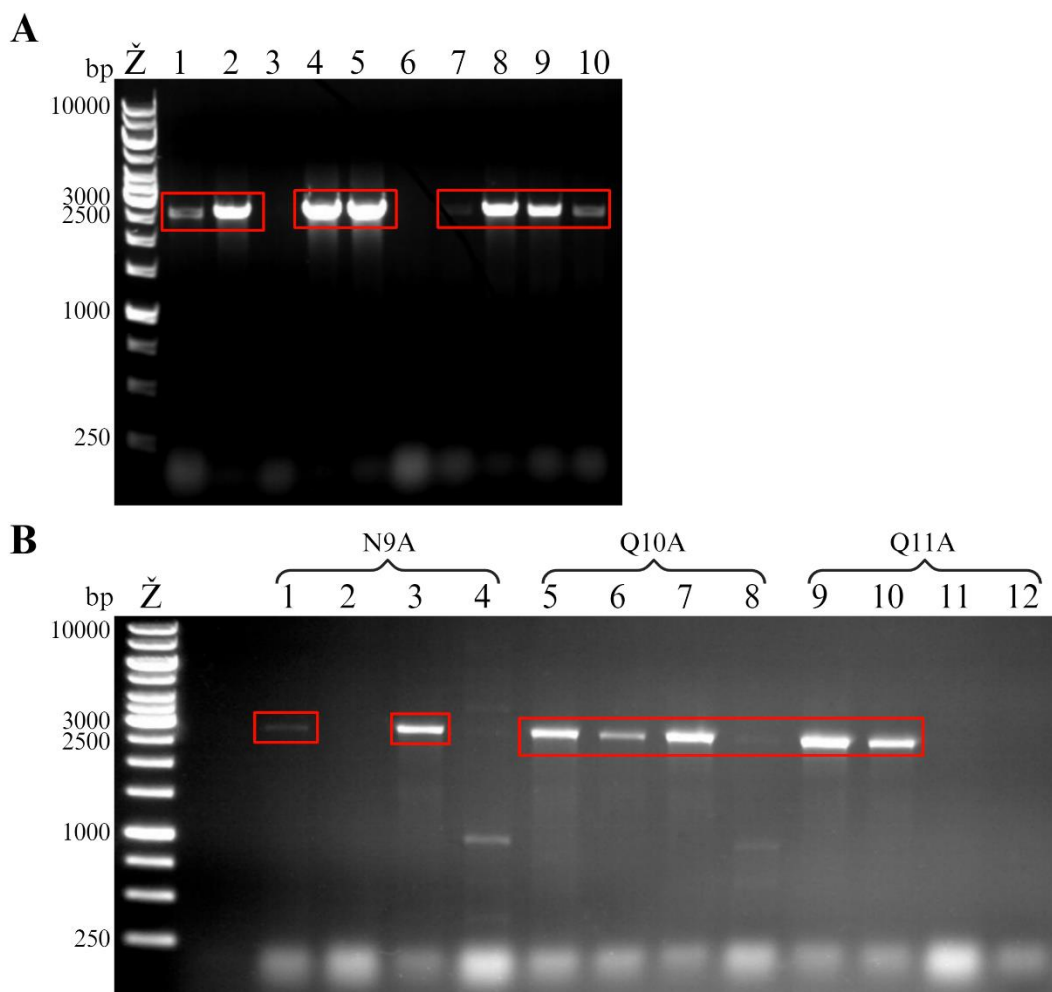


3.2 pav. Ant kietos LB^{+amp} terpės užaugusios ląstelių kolonijos po cheminės transformacijos su pJET-N8A, pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A vektoriais. A – pavaizduotos po cheminės transformacijos užaugusios ląstelių kolonijos, kurios buvo transformuotos vektoriumi, galimai turinčiu nurodytą mutaciją. B – teigiama (+K) ir neigiama (-K) kontrolės, naudotos atliekant transformaciją su pJET-N8A vektoriumi; +K naudota pRSCupSup35-GFP plazmidė, turinti natyvų *SUP35-GFP* geną, o -K – ląstelės nebuvo inkubuotos su vektoriumi. C – teigiama (+K) ir neigiama (-K) kontrolės, naudotos atliekant transformaciją su pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A vektoriais; +K naudota pRSCupSup35-GFP plazmidė, turinti natyvų *SUP35-GFP* geną, o -K – ląstelės nebuvo inkubuotos su vektoriumi.

Remiantis 3.2 pav. pateiktais rezultatais, galima teigti, kad transformuotos *E. coli* bakterijos geba augti ant atrankios LB^{+amp} terpės. Bakterijų transformacija su pJET-N8A vektoriumi (toliau – pirmoji transformacija) ir transformacijos su pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A vektoriais (toliau – antroji transformacija) buvo atliktos nepriklausomai, todėl pateikiami 4 kontroliniai ląstelių mėginiai (3.2 pav. B, C). Po pirmosios transformacijos galima matyti daugiau nei 500 užaugusių

transformantų kolonijų (3.2 pav. A pJET-N8A), o po antrosios transformacijos matomos 26, 104 ir 62 transformantų kolonijos atitinkamai pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A (3.2 pav. A). Lyginant užaugusių kolonijų kiekį po pirmosios transformacijos su kolonijų kiekiu po antrosios transformacijos, matomas ryškus skirtumas – po pirmosios transformacijos stebimas gausnesnis kolonijų augimas tiek kontroliniame, tiek mėginiuose. Toks rezultatas galėjo priklausyti nuo kompetentinių ląstelių paruošimo arba efektyvesnio pJET1.2/blunt ir tikslinių fragmentų su skirtingomis mutacijomis ligavimo. Neigiamose kontrolėse (3.2 pav. B, C „-K“) nepastebėtas kolonijų augimas. Tokio rezultato ir tikėtasi, kadangi ląstelės neturinčios vektoriaus su atsparumo ampicilinui genu, negali išgyventi ant atrankios terpės, papildytos ampicilinu (Bangen ir kt., 2004).

Pagal pJET1.2/blunt vektoriaus protokolą, kurį pateikia gamintojas, teigiama, kad ląstelės, po transformacijos turinčios vektorių be įterpto tikslinio fragmento, išsėtos ant mitybinės terpės neišgyvens, nes tokiu atveju vektoriuje esantis letalus genas *eco417IR* nebus pertraukiamas ir bus susintetinamas. Visgi siekiant įsitikinti, kad ląstelės tikrai turi vektorių su reikiamo ilgio insertu, buvo atliekamas kolonijų PGR, o gauti mėginiai analizuojami DNR elektroforeze agarozės gelyje (3.3 pav.).

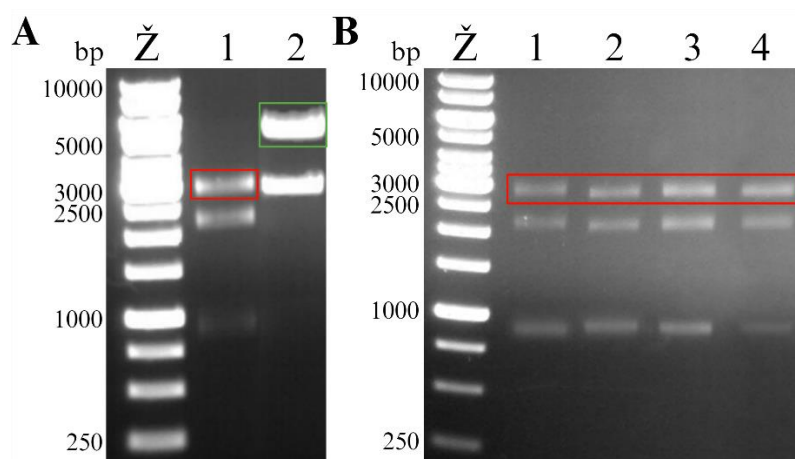


3.3 pav. Kolonijų PGR mėginių analizė DNR elektroforeze agarozės gelyje po *E. coli* DH5α ląstelių transformacijos pJET-N8A, pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A vektoriais. A) Ž – GeneRuler 1 kb

DNR žymeklis, 1–10 – PGR mėginiai, kuriems buvo atsitiktinai pasirinktos transformantų kolonijos, kurių transformacijai naudotas N8A mutaciją galimai turintis vektorius. B) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1–12 – PGR mėginiai, kuriems buvo atsitiktinai pasirinktos transformantų kolonijos, kurių transformacijai naudoti N9A (1–4), Q10A (5–8), Q11A (9–12) mutacijas galimai turintys vektoriai. Raudonais stačiakampiais pažymėti pagausinti tiksliniai fragmentai, kurie išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių, kas atitinka teorinį tikslinių fragmentų dydį – 2,785 kb.

Pagal 3.3 pav. A matomus rezultatus, nustatyta, kad N8A mutacijos atveju 8 iš 10 atsitiktinai pasirinktų transformantų kolonijų turėjo plazmidę su tiksliniu fragmentu. Fragmentai išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių, o tai atitinka ir teorinį inserto dydį (2,785 kb) (Addgene: pRSCupSup35GFP; Uckert ir kt., 2000). Iš transformantų kolonijų, kurių transformacija atlikta su pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A vektoriais, pasirinkta patikrinti po 4 kolonijas (3.3 pav. B). nustatyta, kad 7 iš 12 tikrintų kolonijų turi tikslinius fragmentus. Matomi fragmentai išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių, o tai atitinka tikslinio fragmento dydį – 2,785 kb.

Remiantis 3.3 pav. matomais rezultatais, teigiamų transformantų pasirinktos kolonijos buvo persėtos ant kietų LB^{+amp} terpių ir inkubuotos 12–16 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos išskirta transformantų plazmidinė DNR, kuri toliau buvo analizuojama taikant restrikciją. Restrikcinės analizės rezultatai pateikti 3.4 pav. Ši analizė naudota siekiant ne tik paruošti tikslinius fragmentus ligavimui su mielių raiškos vektoriumi pRSCup, bet taip pat buvo patikrinti tikslinių fragmentų bei vektorių molekuliniai dydžiai. Iš „Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros“ muziejuje saugomų *E. coli* DH5α kamieno ląstelių, turinčių pRSCupSup35-GFP plazmidę, buvo išskirta minėta plazmidė (3.4 pav. A 2 takelis). Šis vektorius taip pat buvo hidrolizuojamas restrikcijos endonukleazėmis su tikslu gauti pRSCup vektoriaus karkasą, kuris toliau bus naudojamas ligavimo reakcijoje su tiksliniais fragmentais.



3.4 pav. Po kolonijų PGR atrinktų *E. coli* DH5α transformantų bei pRSCupSup35-GFP plazmidžių restrikcinė analizė. A) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1 – pJET-N8A vektorius, hidrolizuotas BamHI, SacII ir ScaI restrikcijos endonukleazėmis, tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių išsidėstęs rekombinantinis Sup35N8A-GFP fragmentas, kas atitinka teorinį tikslinio fragmento dydį (2,785 kb), ties 2,5 kb ir 1 kb žymeklio juostelėmis išsidėstę pJET1.2/blunt vektoriaus fragmentai; 2 – pRSCupSup35-GFP vektorius, hidrolizuotas BamHI ir SacII restrikcijos endonukleazėmis, ties 5 kb žymeklio juoste

išsidėstęs pRSCup vektoriaus karkasas, o ties ~3 kb išsidėstęs natyvus Sup35-GFP fragmentas. B) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1, 2, 3 – pJET-N9A, pJET-Q10A ir pJET-Q11A vektoriai atitinkamai, kurie buvo hidrolizuoti BamHI, SacII ir ScaI restrikcijos endonukleazėmis, tiksliniai fragmentai išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelėmis, kas atitinka teorinį tikslinių fragmentų dydį (2,785 kb), ties 2,5 kb ir 1 kb žymeklio juostelėmis išsidėstę pJET1.2/blunt vektoriaus fragmentai. Žaliu ir raudonais stačiakampiais pažymėti tiksliniai fragmentai: žaliu stačiakampiu apibrauktas pRSCup vektoriaus karkasas, o raudonais stačiakampiais – tiksliniai fragmentai, galimai turintys įvestas mutacijas.

Remiantis gautais rezultatais (3.4 pav.) padaryta išvada, kad naudoti pJET-N8A, pJET-N9A, pJET-Q10A, pJET-Q11A bei pRSCupSup35-GFP vektoriai buvo tinkamai hidrolizuoti restrikcijos endonukleazėmis bei atitinka teorinius dydžius. Svarbu paminėti, kad skirtingas kiekis gautų fragmentų po DNR restrikcijos reakcijos matomas todėl, kad pJET1.2/blunt plazmidės buvo hidrolizuojamos naudojant 3 restriktazes – BamHI, SacII ir ScaI, o pRSCupSup35-GFP plazmidės hidrolizei naudotos 2 restriktazės – BamHI ir SacII. Klonavimo vektorius pJET1.2/blunt papildomai hidrolizuotas ScaI restriktaze, nes priešingu atveju, tikslinių fragmentų ir vektoriaus karkasų molekuliniai dydžiai būtų labai panašūs (2,785 kb ir 2,974 kb atitinkamai), todėl gryninimo iš gelio metu fragmentus būtų sunku tinkamai atskirti.

3.4 pav. A1 galima matyti, kad tikslinis fragmentas, galimai turintis N8A mutaciją, išsidėsto ties 3 kb žymeklio juoste, kas atitinka teorinį tikslinio fragmento dydį (2,785 kb). Ties 2,5 kb ir 1 kb išsidėsto pJET1.2/blunt vektoriaus fragmentai. 3. 4 pav. A2 matomi išsidėstę pRSCupSup35-GFP restrikcijos endonukleazėmis hidrolizuoti fragmentai. Ties 5 kb žymeklio juoste išsidėstęs pRSCup vektoriaus karkasas, o ties 3 kb – natyvus Sup35-GFP fragmentas. Pagal 3.4 pav. B matyti, jog tiksliniai fragmentai išsidėsto ties 3 kb žymeklio juoste, kas taip pat atitinka teorinį tikslinių fragmentų dydį (2,785 kb). Ties 2,5 kb ir 1 kb išsidėstę pJET1.2/blunt vektoriaus fragmentai. Visi tiksliniai fragmentai (3.4 pav. žaliu ir raudonais stačiakampiais pažymėti fragmentai) buvo išpjauti iš gelio ir išgryninti, kad būtų galima toliau atlikti antrąją ligavimo reakciją.

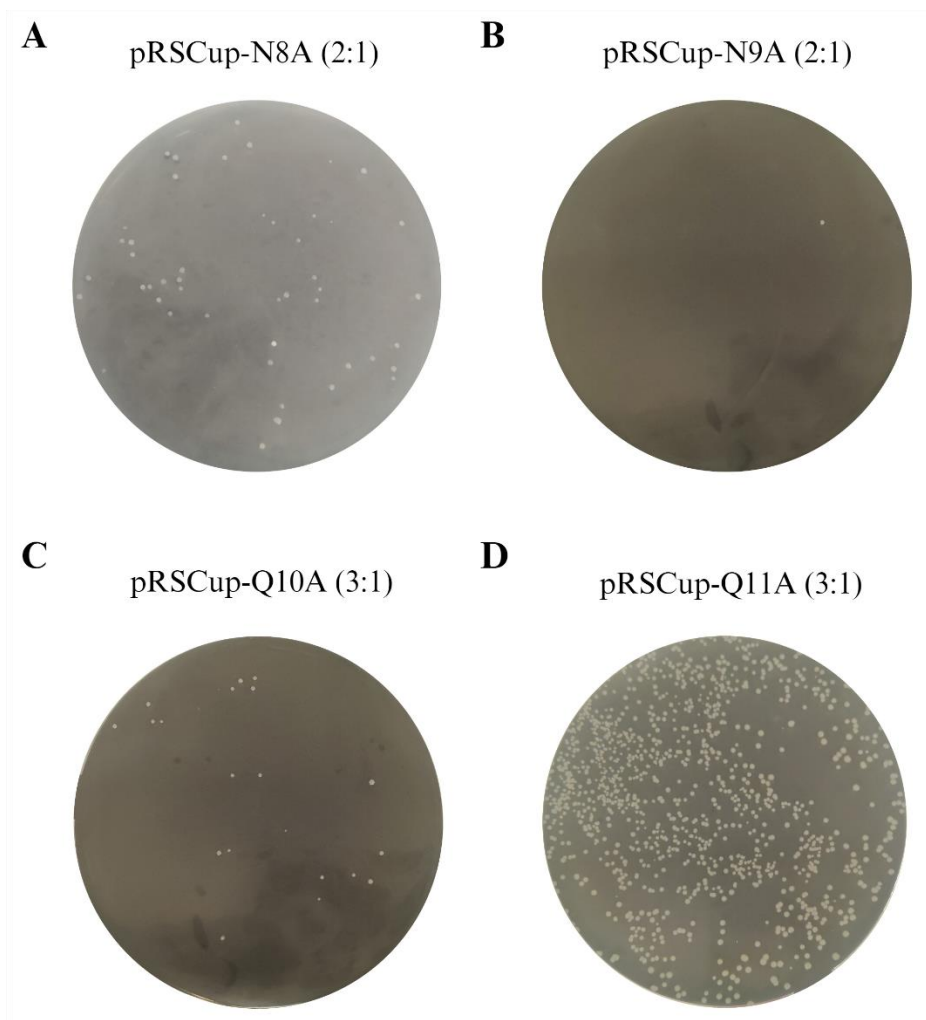
3.1.3. Tikslinių genų įterpimas į mielių raiškos vektorių ir perkėlimas į *E. coli* DH5a kamieno ląsteles

Po restrikcinės analizės gauti ir iš gelio išgryninti tiksliniai fragmentai ir pRSCup vektoriaus karkasas turi 5' ir 3' lipnius galus, todėl yra tinkami ligavimo reakcijai atlikti. Šiai reakcijai atlikti buvo reikalinga apsisikaičiuoti, kokie inserto:vektoriaus kiekiai būtų tinkami naudoti pagal inserto bei vektoriaus dydžius. Skaičiavimai atlikti naudojantis NEBioCalculator[®] svetaine. Pasirinkti 1:1, 2:1 ir 3:1 inserto:vektoriaus santykiai. Atlikus ligavimo reakciją gauti 4 vektoriai, turintys skirtingas mutacijas:

- pRSCupSup35N8A-GFP (toliau pRSCupN8A),
- pRSCupSup35N9A-GFP (toliau pRSCupN9A),
- pRSCupSup35Q10A-GFP (toliau pRSCupQ10A),

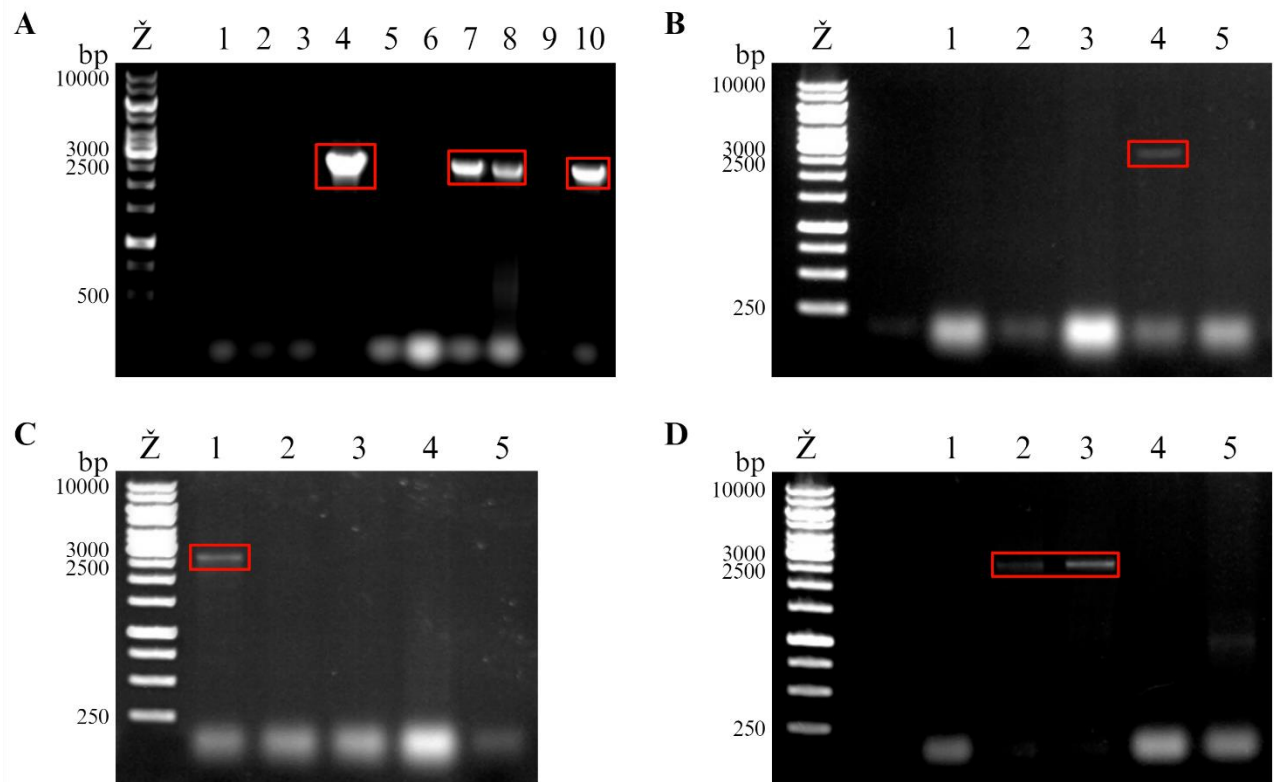
- pRSCupSup35Q11A-GFP (toliau pRSCupQ11A).

Toliau sukurti vektoriai buvo naudojami cheminei *E. coli* DH5 α kamieno ląstelių transformacijai siekiant juos pagausinti. 3.5 pav. pateiktos tik tų kietų LB^{+amp} terpių nuotraukos, ant kurių užaugusios transformantų kolonijos buvo panaudotos tolesniuose darbuose (kitų lėkštelių nuotraukos pateikiamos 2 priede).



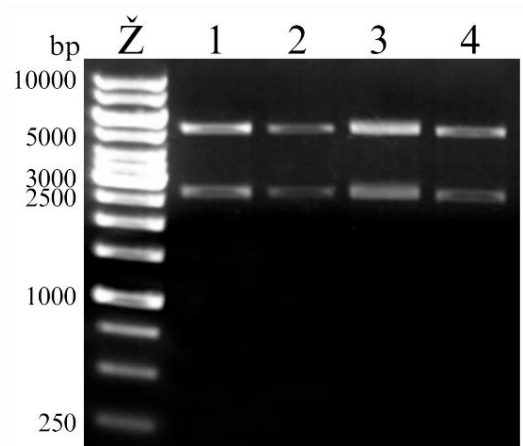
3.5 pav. Ant kietos LB^{+amp} terpės užaugusios ląstelių kolonijos po cheminės transformacijos su pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriais. Pavaizduotos po cheminės transformacijos užaugusios ląstelių kolonijos, kurios buvo transformuotos pRSCup-N8A (A), pRSCup-N9A (B), pRSCup-Q10A (C) ir pRSCup-Q11A (D) vektoriais, galimai turinčiais nurodytas mutacijas. Skliaustuose nurodytas inserto:vektoriaus kiekis, naudotas tikslių fragmentų ir pRSCup vektoriaus ligavimo reakcijoje.

Remiantis 3.5 pav. rezultatais, galima teigti, kad transformuotos *E. coli* DH5 α kamieno ląstelės gebėjo augti ant atrankios LB^{+amp} terpės, vadinasi transformacija pavyko – į ląsteles sėkmingai perkeltas pRSCup vektorius. Taip pat, pastebėtas skirtingas transformantų kolonijų kiekis – 27, 1, 24 ir daugiau nei 800 kolonijų atitinkamai (3.5 pav. A, B, C, D), kuri galėjo nulemti ligavimo reakcijos efektyvumas. Siekiant nustatyti teigiamų transformantų kolonijas, buvo atsitiktinai pasirinktos transformantų kolonijos ir atliktas kolonijų PGR. Gauti mėginiai buvo analizuojami taikant elektroforezę agarozės gelyje (3.6 pav.).



3.6 pav. Kolonijų PGR mėginių analizė DNR elektroforeze agarozės gelyje po *E. coli* DH5a ląstelių transformacijos sukurtais raiškos vektoriais. A) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1–10 – PGR mėginiai, kuriems buvo atsitiktinai parinktos transformantų kolonijos, galimai turinčios insertą su N8A mutacija. B) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1–5 – PGR mėginiai, kuriems buvo atsitiktinai parinktos transformantų kolonijos, galimai turinčios insertą su N9A mutacija. C) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1–5 – PGR mėginiai, kuriems buvo atsitiktinai parinktos transformantų kolonijos, galimai turinčios insertą su Q10A mutacija. D) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1–5 – PGR mėginiai, kuriems buvo atsitiktinai parinktos transformantų kolonijos, galimai turinčios insertą su Q11A mutacija. Raudonais stačiakampiais pažymėti pagausinti tiksliniai fragmentai.

Pagal gautus rezultatus matyti (3.6 pav. A), kad iš 10 tirtų kolonijų 4 turi tinkamo dydžio Sup35N8A-GFP insertą, kuris išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių, o tai atitinka ir teorinį inserto dydį (2,785 kb) (Addgene: pRSCupSup35GFP; Uckert ir kt., 2000). Atliekant kolonijų PGR su kitais sukurtais insertais buvo pasirinkta patikrinti po 5 kolonijas, pagal gautus rezultatus teigiamų transformantų nustatyta po vieną (3.6 pav. B ir C) arba du (3.6 pav. D). Remiantis 3.6 pav. rezultatais teigiami transformantai buvo persėjami ant kietų LB^{+amp} terpių ir inkubuojami 12–16 val. 37 °C. Tuomet buvo išskiriama transformantų plazmidinė DNR ir analizuojama taikant restrikcinę analizę. Reakcijos produktai analizuoti taikant DNR elektroforezę agarozės gelyje (3.7 pav.).

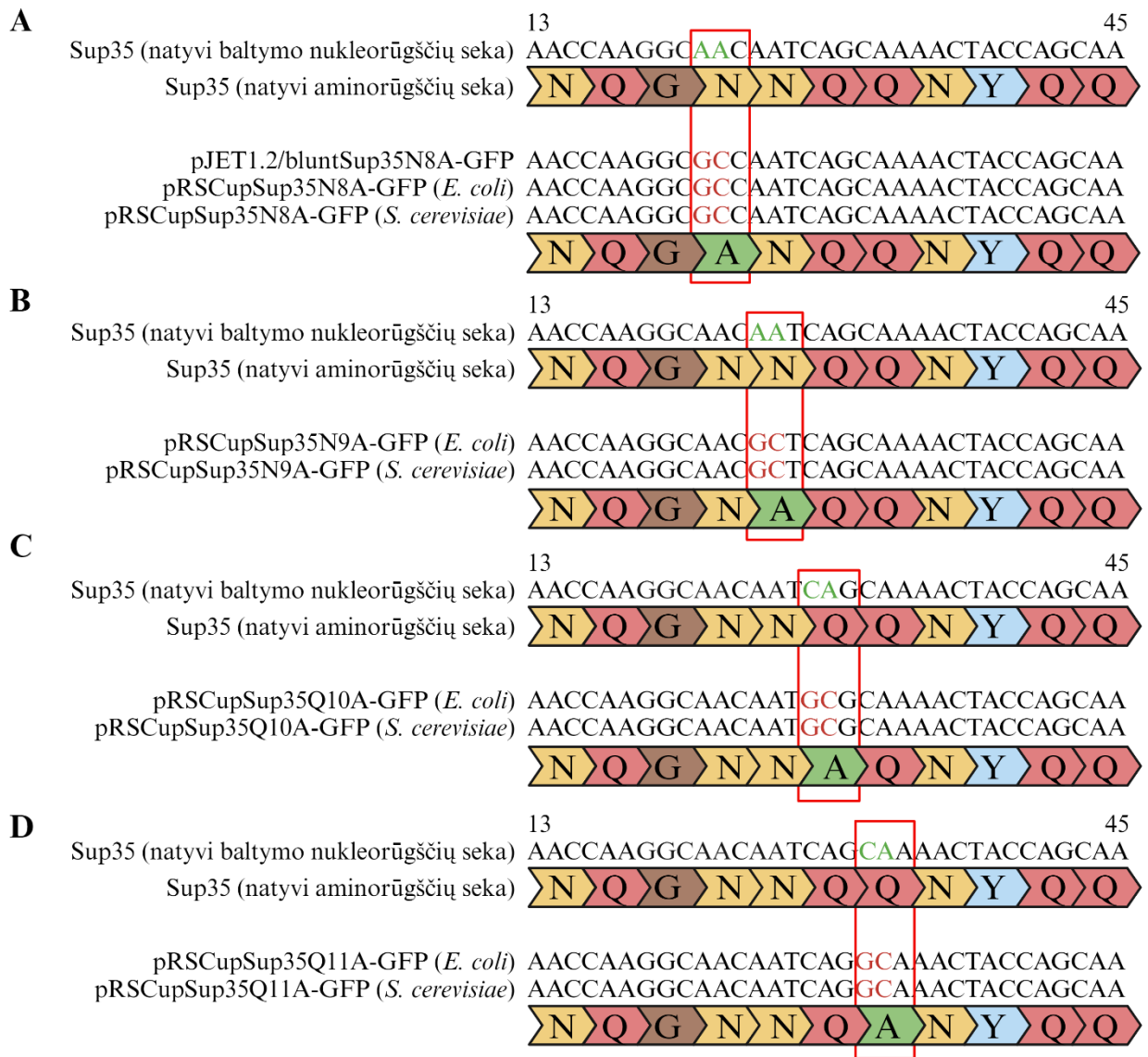


3.7 pav. Sukurtų pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektorių restrikcinės analizės produktų analizė DNR elektroforeze agarozės gelyje. Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, 1, 2, 3, 4 – restrikcijos endonukleazių BamHI ir SacII hidrolizuotos plazmidės, turinčios tikslinius fragmentus su N8A, N9A, Q10A arba Q11A mutacijomis atitinkamai. Ties 5 kb žymeklio juostele išsidėsto pRSCup vektoriaus karkasas, o tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių – tiksliniai fragmentai.

Pagal 3.7 pav. gautą rezultatą patvirtinta, kad visi sukurti pRSCup vektoriai turi teorinį inserto dydį atitinkančius tikslinius fragmentus, kurie išsidėsto tarp 3 kb ir 2,5 kb žymeklio juostelių. Po restrikcinės analizės patvirtintos plazmidės, buvo siunčiamos sekoskaitai, kad būtų patvirtintas mutacijų buvimas.

3.1.4. Sukurtų Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantinių variantų analizė sekoskaitos būdu

Siekiant patvirtinti, ar kuriami baltymo Sup35 GNNQQNY sekos mutantiniai variantai tikrai turi N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijas, gautos plazmidės buvo pateikiamos „Azenta Life Sciences“ sekoskaitos tyrimui atlikti. Sekoskaitai pateiktos po restrikcinės analizės patvirtintos pJET1.2/blunt bei pRSCup plazmidės, turinčios tinkamo dydžio tikslinius genus. Taip pat, pateikti ir išgryninti PGR produktai po mielių kolonijų PGR su tikslu patvirtinti, kad į mielių ląsteles perkeltos plazmidės su tiksliniais fragmentais vis dar turi įvestas mutacijas. Gauti sekoskaitos rezultatai pateikti 3.8 pav.



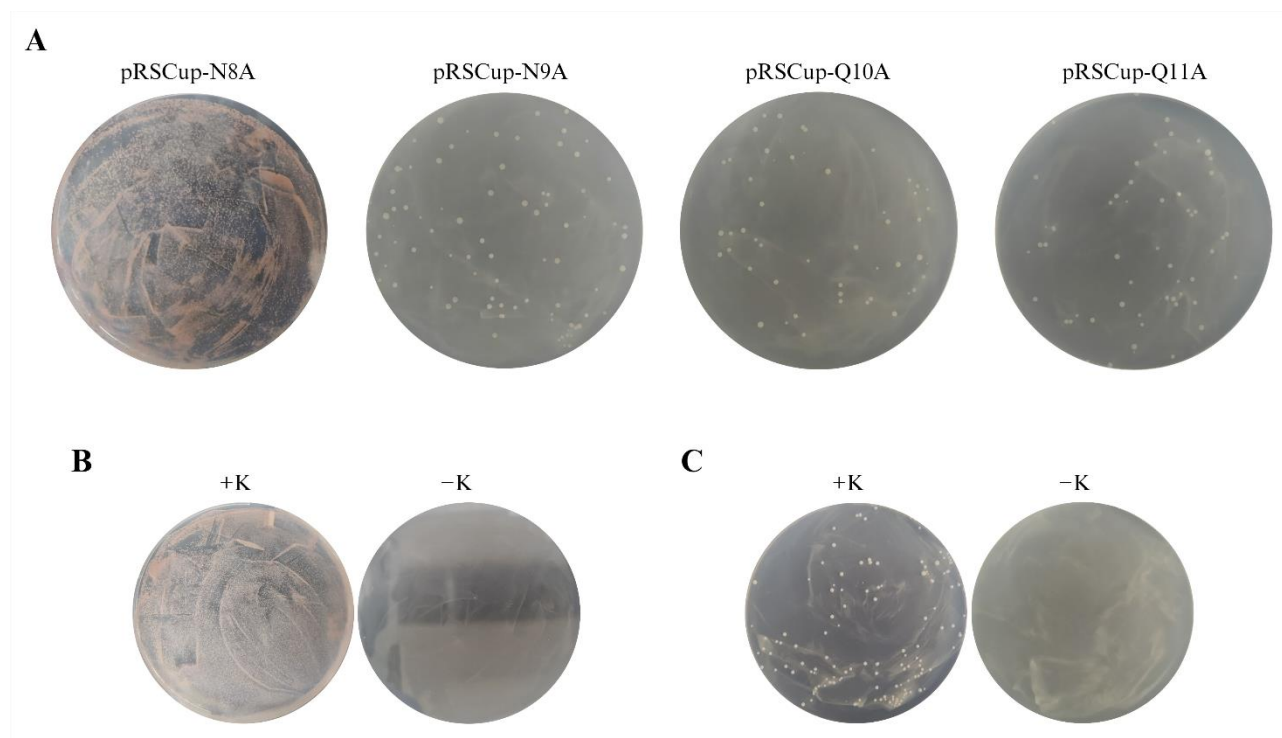
3.8 pav. Apibendrinti sekoskaitos rezultatai, gauti nusekvenuotas sekas sulyginant su natyvia Sup35 „Benchling“ svetainės pagalba.

Pagal gautus rezultatus (3.8 pav.) padaryta išvada, kad Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantiniai variantai sukurti sėkmingai. Galima matyti, kad įvestos N8A, N9A, Q10A ir Q11A (3.8 pav. A, B, C, D atitinkamai) mutacijos atliekant įvairius tyrimo žingsnius nebuvo ištaisytos ir išliko tikslinių baltymų nukleorūgščių sekose visų etapų metu. Svarbu paminėti, kad kitų pakitimų tiksliniuose fragmentuose, nei norėta įvesti, nebuvo pastebėta (šiuo darbe neįtraukta dėl duomenų gausos ir apsunkinto jų pateikimo).

3.2. Rekombinantinių baltymų sintezės analizė *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse

3.2.1. Mielių ląstelių cheminė transformacija

Siekiant atlikti sukurtų baltymo Sup35 GNNQQNY sekos mutantinių variantų sintezę *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse, buvo atlikta cheminė mielių ląstelių transformacija. Šis mielių kamienas turi *ura3–52* mutaciją, kuri nulemia tai, jog mielių ląsteles po transformacijos galima atrinkti pagal auksotrofiškumą, nes šios negeba sintetinti uracilo (Gene: URA3 (YEL021W) - Summary - *Saccharomyces cerevisiae* - Ensembl; Krastanova ir kt., 2005; Žvingila, 2008). Šiame darbe naudojamas mielių raiškos vektorius pRSCup, turintis *URA3* geno kopiją, leidžia vektorių turinčioms ląstelėms augti terpėje be uracilo. Mielių ląstelių transformacija atlikta su sukurtais pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriais. Gauti rezultatai pateikti 3.9 pav.

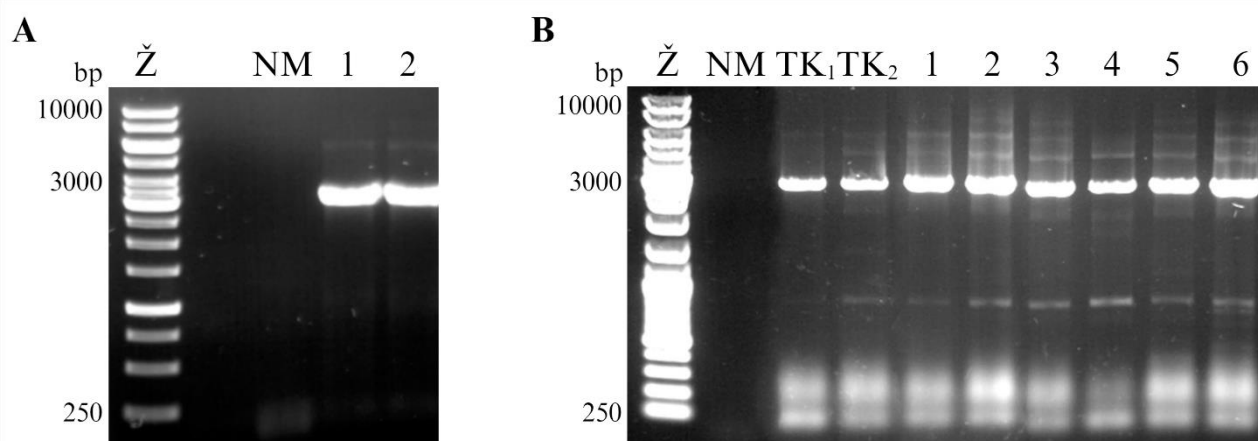


3.9 pav. Ant kietos SC^{-ura} terpės užaugusios ląstelių kolonijos po cheminės mielių transformacijos su pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriais. A – pavaizduotos po cheminės transformacijos užaugusios ląstelių kolonijos, kurios buvo transformuotos atitinkamai nurodytais vektoriais. B – teigiama (+K) ir neigiama (-K) kontrolės, naudotos atliekant transformaciją su pRSCup-N8A vektoriumi; +K naudota pRSCupSup35-GFP plazmidė, turinti natyvų *SUP35-GFP* geną, o -K – ląstelės nebuvo inkubuotos su vektoriumi. C – teigiama (+K) ir neigiama (-K) kontrolės, naudotos atliekant transformaciją su pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriais; +K naudota pRSCupSup35-GFP plazmidė, turinti natyvų *SUP35-GFP* geną, o -K – ląstelės nebuvo inkubuotos su vektoriumi.

Pagal 3.9 pav. matomus rezultatus galima teigti, kad mielių ląstelių transformacija pavyko sėkmingai, nes matomas ląstelių kolonijų augimas ant turtingos sintetinės terpės be uracilo (SC^{-ura}). Lyginant gautus rezultatus matomas ryškus skirtumas tarp pRSCup-N8A ir pRSCup-N9A, pRSCup-

Q10A, pRSCup-Q11A transformantų kolonijų kiekio – matoma daugiau nei 1000, 89, 52, 58 kolonijos atitinkamai. Tokio rezultato priežastis galėtų būti, kad pirmosios transformacijos su pRSCup-N8A vektoriumi metu buvo arba panaudotas per didelis plazmidės kiekis transformacijos mišinyje, arba ant atrankios SC^{ura} terpės buvo išsėtas per didelis ląstelių kiekis (Bergkessel ir Guthrie, 2013a).

Literatūros šaltiniuose teigiama, kad mielių ląstelės pasižymi didelių plastiškumu priimdamos svetimą DNR (Gibson ir kt., 2008a; Gibson ir kt., 2008b). Dėl šios priežasties mielių transformantų kolonijos buvo analizuotos kolonijų PGR metodu. Šis metodas padėjo nustatyti teigiamus transformantus ir atrinkti tuos teigiamus transformantus, kurie neturi arba turi kuo mažiau pagausintų netikslinių fragmentų. Atlikus kolonijų PGR gauti mėginiai buvo analizuoti DNR elektroforeze agarozės gelyje. Šiuo atveju naudoti kiti pradmenys (2.4 lentelė) bei kita polimerazė nei bakterijų kolonijų PGR atveju (šiuo atveju Phusion), nes reikalingi be klaidų pagausinti fragmentai, kuriuos išgryninus būtų galima pateikti sekoskaitai tikslinių mutacijų buvimo nustatymui. Kolonijų PGR mėginių analizės rezultatai pateikti 3.10 pav.

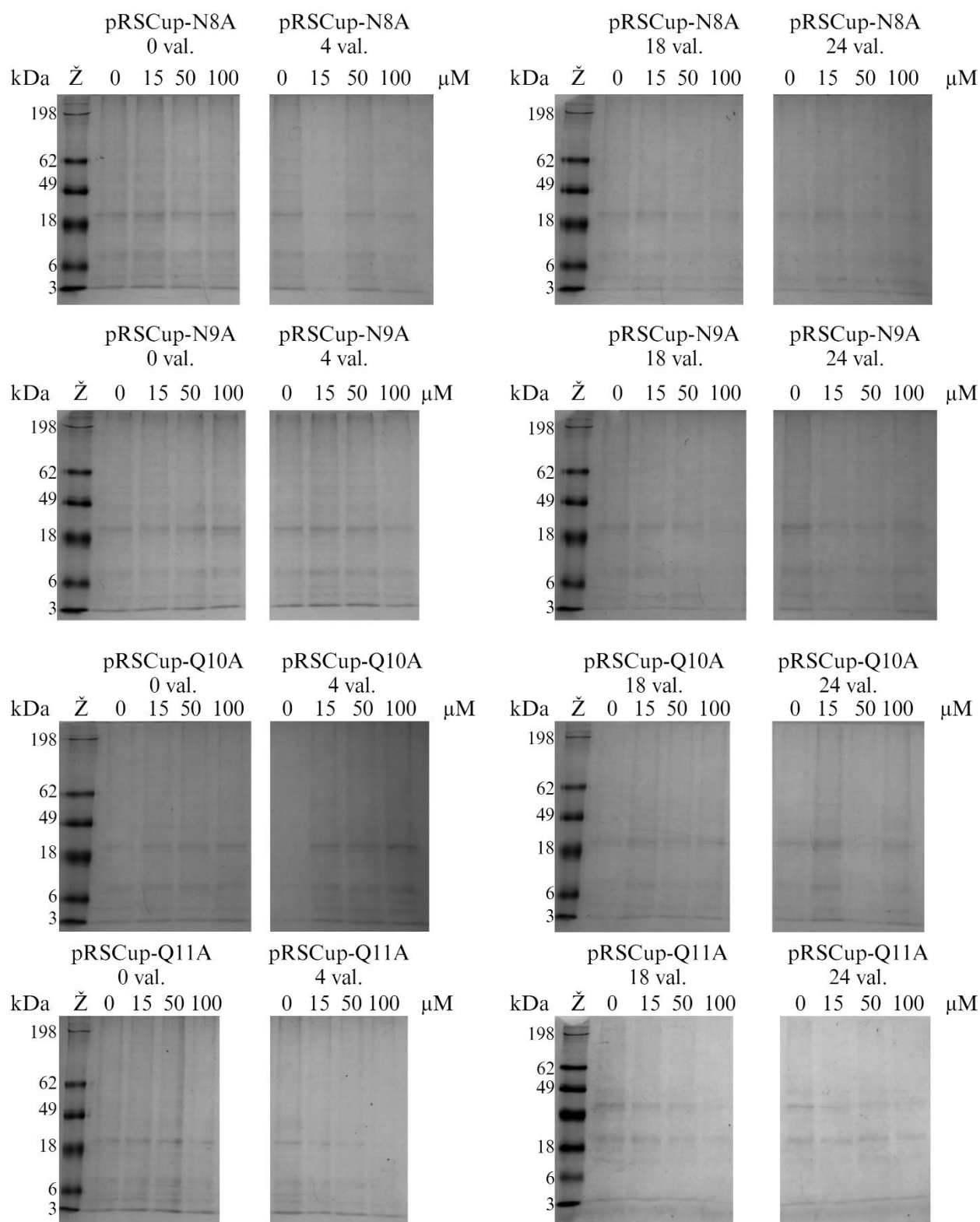


3.10 pav. Mielių kolonijų PGR mėginių analizė elektroforeze agarozės gelyje. A) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, NM – PGR mėginys, kuriam buvo pasirinkta vektoriaus neturinti mielių kolonija, 1–2 – PGR mėginiai, kuriems atsitiktinai pasirinktos 2 kolonijos galimai turinčios pRSCup-N8A vektorių. B) Ž – GeneRuler 1 kb DNR žymeklis, NM – PGR mėginys, kuriam buvo pasirinkta vektoriaus neturinti mielių kolonija, TK_n – PGR mėginiai, kuriems buvo pasirinktos atsitiktinės mielių kolonijos turinčios pRSCupSup35-GFP vektorių (teigiama kontrolė), 1–2 – PGR mėginiai, kuriems atsitiktinai pasirinktos 2 kolonijos galimai turinčios pRSCup-N9A vektorių, 3–4 – PGR mėginiai, kuriems atsitiktinai pasirinktos 2 kolonijos galimai turinčios pRSCup-Q10A vektorių, 5–6 – PGR mėginiai, kuriems atsitiktinai pasirinktos 2 kolonijos galimai turinčios pRSCup-Q11A vektorių. Tiksliniai fragmentai išsidėsto ties 3 kb žymeklio juoste, o tai atitinka teorinį inserto dydį – 2,785 kb.

Pagal 3.10 pav. rezultatus galima teigti, jog cheminei mielių ląstelių transformacijai naudoti pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriai pateko į ląsteles. Matomi tiksliniai fragmentai, išsidėstę ties 3 kb žymeklio juoste, o tai atitinka teorinį inserto dydį (2,785 kb) (Addgene: pRSCupSup35GFP; Uckert ir kt., 2000).

3.2.2. Mielių ląstelių išskirtų baltymų analizė NDS-PAGE

Siekiant įvertinti baltymo Sup35 GNNQQNY sekos mutantinių variantų sintezę *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse, buvo indukuojama tikslinio geno raiška. Tiksliniai mutantiniai Sup35 baltymą koduojantys genai yra įterpiami šalia vario jonais indukuojamo *CUP1* promotoriaus, esančio pRSCup vektoriuje (Sikorski ir Hieter, 1989). Šiame darbe indukcijai naudotas sterilus vario sulfato tirpalas, kuris buvo pridedamas į SC su arba be uracilo terpę, kurioje buvo auginamos mielių ląstelės, turinčios arba ne atitinkamus vektorius. Atlikus auginimus, šarminės lizės metodu buvo išskiriami visi ląstelės baltymai. Gauti mėginiai analizuoti NDS-PAGE metodu, o gauti rezultatai pateikti 3.11 pav. (gautų kontrolinių mėginių rezultatai pateikti 3 priede).



3.11 pav. *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelių, turinčių pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A arba pRSCup-Q11A vektorių, baltymų analizė NDS-PAGE metodu. Ž – baltymų dydžio žymeklis SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard. Pateikti po indukcijos iš surinktų ląstelių išskirti baltymai. Ląstelių mėginiai buvo surenkami 0 val. ir po 4 val., 18 val. ir 24 val. Tyrimo metu terpės, kuriose buvo kultivuojamos mielių ląstelės, turinčios pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A arba pRSCup-Q11A vektorius, buvo papildomos induktoriumi (vario sulfato tirpalas) iki galutinės 15–100 μM koncentracijos.

Tiksliniai baltymai yra ~103 kDa dydžio (Park ir kt., 2022), todėl analizės metu didžiausias dėmesys kreiptas į poliakrilamidinio gelio dalį, kur pagal naudotą žymeklį turėtų būti išsidėstę tokio dydžio baltymai. Deja, bet remiantis gautais rezultatais (3.11 pav.), negalima nustatyti, ar ties 100 kDa žyme yra išsidėstę tiksliniai baltymai. Tokio rezultato priežastys galėtų būti nesėkmingas visų ląstelės baltymų skyrimas. Tikėtina, kad siekiant nustatyti mutuotų tikslinių baltymų sintezę pasirinkto kamieno mielių ląstelėse, reikėtų išbandyti kitokį visų ląstelės baltymų skyrimą arba modifikuoti naudotą šarminės lizės metodą.

Literatūros šaltiniuose nėra pakankamai daug publikacijų, kuriose būtų aprašytas efektyvus mielių ląstelių baltymų išskyrimas. Efektyviai išskirti baltymus iš mielių ląstelių yra sunku tiek dėl didelio endogeninės proteazės aktyvumo, tiek dėl labai atsparios ląstelės sienelės. Dėl šių priežasčių, dauguma literatūroje pateikiamų baltymų išskyrimo protokolų iš mielių ląstelių lizės metodu yra neoptimalūs (Mukherjee ir kt., 2020). Labai svarbu standartizuoti efektyvų baltymų išskyrimo metodą mielių baltymų analizei elektroforezės būdu (Bhukya ir kt., 2011). Mielių ląstelių sienelė yra dinamiška struktūra, apsauganti ląstelę nuo osmosinio slėgio pokyčių ir kitų aplinkos streso sąlygų, tuo pačiu leidžianti mielių ląstelei sąveikauti su aplinka (Bowman ir Free, 2006).

Vieno tyrimo metu buvo analizuotas mielių baltymų išskyrimas šarminės lizės metodu ir siekta išsiaiškinti, kaip padidinti baltymų išeigas, išskiriant juos šarminės lizės metodu (Bhukya ir kt., 2011). Pasak tyrimo autorių, ląstelių sienelių porėtumą padidina NaOH buferis ir NDS-PAGE dažo buferyje esantis 2-merkaptoetanolis, todėl baltymai gali per susidariusias poras patekti į aplinką. Taip pat, teigiama, jog inkubuojant ląsteles NaOH tirpale, ląstelės membrana pažeidžiama taip, kad mažos molekulės gali lengvai išsiskirti iš ląstelių į aplinką. Tuo tarpu, ląsteles verdant mėginio buferyje, gali išsiskirti didesnės baltymo molekulės. Literatūroje teigiama, kad įprastai šarminės lizės metodas yra labai efektyvus, tačiau egzistuoja ir keletas metodo trūkumų. Visų pirma, kaip ir minėta anksčiau, ląstelių inkubacijos su NaOH tirpalu metu, išsiskiria maži baltymai (<15 kDa), todėl galutiniame ekstrakte jų gali būti nepakankamai. Antra, mielių ląstelės išlieka gyvybingos inkubacijos su NaOH tirpalu pradžioje (Horvath ir Riezman, 1994). Dėl šios priežasties ląstelės gali spėti sureaguoti į aršias aplinkos sąlygas, ko pasekoje gali atsirasti reikšmingų proteomo pokyčių, o galutinis ekstraktas gali neatspindėti proteomo sudėties normaliomis auginimo sąlygomis. Galiausiai, dėl pakartotinių centrifugavimo ir resuspensijos etapų galimas dalinis ląstelių praradimas, kurį sunku kontroliuoti (Bhukya ir kt., 2011). Siekiant išvengti šių problemų, tyrimo autoriai siūlo surinktas ląsteles suspenduoti tirpale, kuriame yra NaOH, 2-merkaptoetanolis ir NDS, o tuomet nedelsiant mišinį pakaitinti 90 °C temperatūroje. Mišinį su ląstelėmis pakaitinus, jis papildomas Tris-HCl buferiu, gliceroliu ir bromo fenolio mėliu. Toks gautas mišinys galėtų būti iš karto naudojamas NDS-PAGE elektroforezei.

Remiantis visais šio darbo metu gautais rezultatais, galima teigti, kad Sup35 baltymo GNNQQNY sekos 4 mutantiniai variantai buvo sėkmingai sukurti ir perkelti į mielių raiškos vektorius pRSCup. Taip pat, sukurti vektoriai buvo sėkmingai perkelti į darbe naudoto mielių kamieno ląsteles. Deja, bet šio darbo metu nepavyko nustatyti tikslinių baltymų sintezės mielių ląstelėse. Tikėtina, kad pritaikius aukščiau pateiktus ląstelių baltymų skyrimo modifikacijas, būtų galima nustatyti, ar tikslinio baltymo sintezė vyksta mielių ląstelėse.

IŠVADOS

1. Taikiniui specifinės mutagenezės per PGR būdu buvo sėkmingai pagausinti tinkamo ~2,8 kb dydžio tiksliniai *SUP35-GFP* genai.
2. *SUP35N8A-GFP*, *SUP35N9A-GFP*, *SUP35Q10A-GFP* ir *SUP35Q11A-GFP* genai buvo sėkmingai klonuoti į pJET1.2/blunt vektorių ir pagausinti *E. coli* DH5 α ląstelėse.
3. *SUP35N8A-GFP*, *SUP35N9A-GFP*, *SUP35Q10A-GFP* ir *SUP35Q11A-GFP* genai buvo sėkmingai klonuoti į pRSCup vektorių ir pagausinti *E. coli* DH5 α ląstelėse.
4. Sukurti pRSCupSup35N8A-GFP, pRSCupSup35N9A-GFP, pRSCupSup35Q10A-GFP ir pRSCupSup35Q11A-GFP vektoriai buvo sėkmingai perkelti į *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląsteles. Sekoskaitos rezultatai patvirtino, kad N8A, N9A, Q10A ir Q11A mutacijos į *SUP35-GFP* geną buvo įvestos sėkmingai.
5. Vykdamas indukciją vario jonais *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno mielių ląstelėse tikslinių baltymų sintezė nevyksta arba baltymų skyrimas buvo neefektyvus.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Gabija Dičpetrytė
Magistro baigiamasis darbas

**MIELIŲ BALTYMO SUP35 GNNQQNY SEKOS MUTANTINIŲ VARIANTŲ KŪRIMAS
IR JŲ SINTEZĖ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LĄSTELĖSE**

SANTRAUKA

Prionai yra baltyminės infekcinės dalelės, kurios geba replikuotis ir plisti kaip infekcija. Prionai sukelia transmisines spongiformines encefalopatijas (TSE) – mirtinas žinduolių neurodegeneracines ligas. Neurodegeneracinės ligos taip pat apima ir amiloidozes, kurios geriau žinomos kaip Alzheimerio, Parkinsono ligos arba tauopatija. Mielių baltymo Sup35 GNNQQNY seka yra pakankama amiloidinei fibrilei susidaryti. Molekulinės dinamikos tyrimo metu nustatyta, kad kelios šios sekos aminorūgštys yra svarbios priono agregacijos procese. Remiantis tokiais rezultatais, pasirinkta tokius mutantinius GNNQQNY sekos variantus sukurti ir *in vivo* sistemoje. Tyrimui buvo pasirinkta atlikti 4 mutacijas – N8A, N9A, Q10A ir Q11A. Mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra plačiai paplitusi modelinė sistema, tinkama prionų tyrimams ir pasižyminti daugeliu konservatyvių mechanizmų su aukštesniaisiais eukariotais. Šioje sistemoje buvo identifikuotas prionų formavimasis, agregacija, plitimas ir eliminacija bei prioninių baltymų tarpusavio sąveikos. Šio darbo tikslas – sukurti Sup35 baltymo GNNQQNY sekos mutantinius variantus ir vario jonais indukuoti tikslinių baltymų sintezę mielių *S. cerevisiae* ląstelėse. Šiam tikslui pasiekti į *SUP35-GFP* geną buvo įvestos tikslinės mutacijos (N8A, N9A, Q10A ir Q11A). Šios mutacijos buvo sukurtos taikant PGR metodus ir klonuotos į vektorius, kad būtų genai pagausinti *Escherichia coli* ląstelėse. Vėliau mutuoti genai buvo perkelti į mielių raiškos vektorius ir įvesti į *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląsteles. Baltymų sintezė mielių ląstelėse buvo indukuota naudojant 15–100 μM vario sulfato tirpalą ir surenkant ląstelių mėginius po 0 val., 4 val., 18 val. ir 24 val. Tyrimo rezultatai parodė, kad tiksliniai genai buvo sėkmingai pagausinti PGR būdu. Sekoskaitos rezultatai patvirtino, kad taikiniui specifinės mutagenezės būdu per PGR į *SUP35-GFP* geną buvo sėkmingai įvestos pasirinktos mutacijos ir jos nebuvo prarastos visų tyrimo etapų metu. Sukurti raiškos vektoriai pRSCupSup35-GFP, turintys tikslines mutacijas, buvo sėkmingai pagausinti *E. coli* ląstelėse ir perkelti į *S. cerevisiae* ląsteles. Deja, bet tikslinių baltymų sintezės nepavyko nustatyti atliekant tikslinių baltymų indukciją vario jonais mielių ląstelėse.

Gabija Dičpetrytė

Master thesis

**CREATION OF MUTANT VARIANTS OF YEAST PROTEIN SUP35 GNNQQNY
SEQUENCE AND THEIR EXPRESSION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS**

SUMMARY

Prions are proteinaceous particles that are able to replicate and spread as an infection. Prions cause transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), a fatal neurodegenerative disease in mammals. Neurodegenerative diseases also include amyloidoses, better known as Alzheimer's, Parkinson's or tauopathy. The sequence of the yeast protein Sup35 GNNQQNY is sufficient for the formation of amyloid fibrils. Molecular dynamics studies have shown that several amino acids in this sequence are important in prion aggregation. On the basis of these results, it was chosen to develop such mutant variants of the GNNQQNY sequence in an *in vivo* system. Four mutations were chosen for the study, N8A, N9A, Q10A and Q11A. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a widespread model system suitable for the study of prions and exhibits many conserved mechanisms with higher eukaryotes. Prion formation, aggregation, proliferation and elimination and interactions between prion proteins have been identified in this system. The aim of the present work was to create mutant variants of the Sup35 protein GNNQQNY sequence and to induce the synthesis of target proteins by copper ions in yeast *S. cerevisiae* cells. To achieve this goal, targeted mutations (N8A, N9A, Q10A and Q11A) were introduced into the *SUP35-GFP* gene. These mutations were generated by PCR and cloned into vectors to amplify the genes in *Escherichia coli* cells. The mutated genes were subsequently transferred into a yeast expression vector and introduced into *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] strain cells. Protein synthesis in yeast cells was induced using 15-100 μM copper sulphate solution and cell samples were collected after 0 h, 4 h, 18 h and 24 h. The results showed that the target genes were successfully amplified by PCR. Sequencing results confirmed that site-specific mutagenesis by PCR was successful in introducing selected mutations into the *SUP35-GFP* gene and that these mutations were not lost during all steps of the study. The constructed expression vectors pRSCupSup35-GFP containing the targeted mutations were successfully amplified in *E. coli* cells and transferred to *S. cerevisiae* cells. Unfortunately, the expression of the target proteins could not be detected by induction of the target proteins with copper ions in yeast cells.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. *Addgene: pRSCupSup35GFP*. (s.a.-a). Gauta 2024 m. gegužės 15 d., <https://www.addgene.org/1087/>
2. *Addgene: pRSCupSup35GFP*. (s.a.-b). Gauta 2024 m. gegužės 25 d., <https://www.addgene.org/1087/>
3. Aguzzi, A. (2006). *Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis*. 1726–1739. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03909.x>
4. Aitmanaitė, L., Konovalovas, A., Medvedevas, P., Servienė, E., & Serva, S. (2021). Specificity determination in *Saccharomyces cerevisiae* killer virus systems. *Microorganisms*, 9(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020236>
5. Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., & Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerging Infectious Diseases, CDC*, 24(6).
6. Balbirnie, M., Grothe, R., & Eisenberg, D. S. (2001). *An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated-sheet structure for amyloid*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.041617698
7. Bangen, K., Hong, N., Louie, A., Mei, G., & Trewartha, J. (2004). The Effects of Incubation with Ampicillin and Tetracycline on the Expression of the bla and tetA genes of pBR322. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* (T. 5). www.bmcd.gov:8080/cgi-bin/query/bmcd/schema/molecule?MO_ID=MOIC
8. Bäumlein, F. J. B., Saha, I., Mishra, A., Kalemánov, M., Martínez-Sánchez, A., Klein, R., Dudanova, I., Hipp, M. S., Hartl, F. U., Baumeister, W., & Fernández-Busnadiego, R. (2017). In Situ Architecture and Cellular Interactions of PolyQ Inclusions. *Cell*, 171(1), 179-187.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.009>
9. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236. <https://doi.org/10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304340>
10. Benestad, S. L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., & Vikøren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free - ranging reindeer. *Veterinary Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0375-4>
11. Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Eisenberg, D. S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., Sekijima, Y., Sipe, J. D., & Westermarck, P. (2020). Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*, 27(4), 217–222. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>
12. Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013a). Chemical transformation of yeast. *Methods in enzymology*, 529, 311–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00026-4>
13. Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013b). Colony PCR. *Methods in Enzymology* (T. 529, p. 299–309). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
14. Berhanu, W. M., & Masunov, A. E. (2010). Natural polyphenols as inhibitors of amyloid aggregation. Molecular dynamics study of GNNQQNY heptapeptide decamer. *Biophysical Chemistry*, 149(1–2), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.03.003>

15. Bhukya, B., Tangutur, A. D., & Reddy, Y. R. (2011). *Optimized Protein Extraction from Yeast (Saccharomyces cerevisiae) for 2-D Gel Electrophoresis* Sudhakara Reddy Marrivada Growel Feeds. www.ejteb.webs.com
16. Bone, I., Belton, L., Walker, A. S., & Darbyshire, J. (2008). Intraventricular pentosan polysulphate in human prion diseases: An observational study in the UK. *European Journal of Neurology*, 15(5), 458–464. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02108.x>
17. Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (1999). *Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents*. 96(March), 4046–4051. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4046>
18. Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/BIES.20441>
19. Bromberg, Y., & Rost, B. (2008). Comprehensive in silico mutagenesis highlights functionally important residues in proteins. *Bioinformatics*, 24(16), i207. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTN268>
20. Cancellotti, E., Barron, R. M., Bishop, M. T., Hart, P., Wiseman, F., & Manson, J. C. (2007). The role of host PrP in Transmissible Spongiform Encephalopathies. *ELSEVIER*, 1772, 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.10.013>
21. Chen, X., Guo, P., Xie, Z., & Shen, P. (2001). A convenient and rapid method for genetic transformation of E. coli with plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek* (T. 80).
22. Chen, Z., Xiao, X., Yang, L., Lian, C., Xu, S., & Liu, H. (2023). Prion-like Aggregation of the Heptapeptide GNNQQNY into Amyloid Nanofiber Is Governed by Configuration Entropy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(20), 6423–6435. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00370>
23. Chernoff, Y., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-vechtomov, S. G., & Liebman, S. W. (1995). *Role of the Chaperone Protein Hsp104 in Propagation of the Yeast Prion-Like Factor [psi ']*. 268(MAY).
24. Chernoff, Y. O., Grizel, A. V, Rubel, A. A., Zelinsky, A. A., Chandramowlishwaran, P., Chernova, T. A., States, U., & States, U. (2021). *Application of yeast to studying amyloid and prion diseases*. 1–77. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.01.002>.Application
25. Chernova, T. A., Chernoff, Y. O., & Wilkinson, K. D. (2019). Yeast models for amyloids and prions: Environmental modulation and drug discovery. *Molecules*, 24(18), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules24183388>
26. Chernova, T. A., Wilkinson, K. D., & Chernoff, Y. O. (2014). Physiological and environmental control of yeast prions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 326–344. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12053>
27. Chernova, T. A., Wilkinson, K. D., & Chernoff, Y. O. (2017). Prions, chaperones, and proteostasis in yeast. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023663>
28. Cox, B. S. (1964). *PSI, a Cytoplasmic Suppressor of Super-Suppressor in Yeast*.
29. Cox, B., & Tuite, M. (2018). The life of [PSI]. *Current Genetics*, 64(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0714-7>
30. Creutzfeldt, H. G. (1920). *Über eine eigenartige herdformige Erkrankung des Zentral- nervensystems*.

31. Danilov, L. G., Matveenko, A. G., Ryzhkova, V. E., Belousov, M. V., Poleshchuk, O. I., Likholetova, D. V., Sokolov, P. A., Kasyanenko, N. A., Kajava, A. V., Zhouravleva, G. A., & Bondarev, S. A. (2019). Design of a New [PSI⁺]-No-More Mutation in SUP35 With Strong Inhibitory Effect on the [PSI⁺] Prion Propagation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 274. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00274>
32. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y., & Liebman, S. W. (2001). *Prions Affect the Appearance of Other Prions : The Story of [PIN⁺]*. *106*, 171–182.
33. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Masse, S. V. L., Zadorsky, S. P., Polozkov, G. V., Inge-vechtomov, S. G., & Liebman, S. W. (2000). *Dependence and independence of [PSI⁺] and [PIN⁺] : a two-prion system in yeast ?* *19*(9).
34. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Zhou, P., Chernoff, Y. O., & Liebman, S. W. (1997). Genetic and Environmental Factors Affecting the de novo Appearance of the [PSI⁺] Prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Society of America*, *29*(7), 522–524.
35. Derkatch, I. L., Chernoff, Y. O., Kushnirov, V. V., Inge-Vechtomov, S. G., & Liebman, S. W. (1996). Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *144*(4), 1375–1386. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.4.1375>
36. Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M., & Paul, S. M. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer^oFs disease model. *Nature Neuroscience*, *5*(5), 452–457. <https://doi.org/10.1038/nn842>
37. Durland, J., & Ahmadian-Moghadam, H. (2022). Genetics, Mutagenesis. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/>
38. Eaglestone, S. S., Cox, B. S., & Tuite, M. F. (1999). Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO Journal*, *18*(7), 1974–1981. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1974>
39. Espargaró, A., Busquets, M. A., Estelrich, J., & Sabate, R. (2016). Key points concerning amyloid infectivity and prion-like neuronal invasion. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00029>
40. Fabret, C., Cosnier, B., Lekomtsev, S., Gillet, S., Hatin, I., Le Maréchal, P., & Rousset, J. P. (2008). A novel mutant of the Sup35 protein of *Saccharomyces cerevisiae* defective in translation termination and in GTPase activity still supports cell viability. *BMC Molecular Biology*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-22/FIGURES/7>
41. Ferrone, F. (1999). Analysis of protein aggregation kinetics. *Methods in Enzymology*, *309*(1), 256–274. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09019-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09019-9)
42. Findeis, M. A., Musso, G. M., Arico-Muendel, C. C., Benjamin, H. W., Hundal, A. M., Lee, J. J., Chin, J., Kelley, M., Wakefield, J., Hayward, N. J., & Molineaux, S. M. (1999). Modified-peptide inhibitors of amyloid β -peptide polymerization. *Biochemistry*, *38*(21), 6791–6800. <https://doi.org/10.1021/bi982824n>

43. Franzmann, T. M., Jahnel, M., Pozniakovsky, A., Mahamid, J., Holehouse, A. S., Nüske, E., Richter, D., Baumeister, W., Grill, S. W., Pappu, R. V., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2018). Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science*, 359(6371). <https://doi.org/10.1126/science.aao5654>
44. Gajdusek, D. C., & Zigas, V. (2010). *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea*.
45. Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Marder, K., Harris, C., Burke, J. R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D. W., Hulette, C. M., Mastrianni, J. A., & Kong, Q. (2009). A Novel Human Disease with Abnormal Prion Protein Sensitive to Protease. *63*(6), 697–708. <https://doi.org/10.1002/ana.21420>
46. Gene: URA3 (YEL021W) - Summary - *Saccharomyces cerevisiae* - Ensembl genome browser 112. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužės 23 d., http://www.ensembl.org/Saccharomyces_cerevisiae/Gene/Summary?g=YEL021W;r=V:116167-116970;t=YEL021W_mRNA
47. Geschwind, M. D., Kuo, A. L., Wong, K. S., Haman, A., Devereux, G., Raudabaugh, B. J., Johnson, D. Y., Torres-Chae, C. C., Finley, R., Garcia, P., Thai, J. N., Cheng, H. Q., Neuhaus, J. M., Forner, S. A., Duncan, J. L., Possin, K. L., Dearmond, S. J., Prusiner, S. B., & Miller, B. L. (2013). Quinacrine treatment trial for sporadic creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 81(23), 2015–2023. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a9f3b4>
48. Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., Merryman, C., Young, L., Noskov, V. N., Glass, J. I., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2008). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1215–1220. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1151721>
49. Gibson, D. G., Benders, G. A., Axelrod, K. C., Zaveri, J., Algire, M. A., Moodie, M., Montague, M. G., Venter, J. C., Smith, H. O., & Hutchison, C. A. (2008). One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20404–20409. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0811011106>
50. Glover, J. R., Kowal, A. S., Schirmer, E. C., Patino, M. M., Liu, J.-J., & Lindquist, S. (1997). Self-Seeded Fibers Formed by Sup35, the Protein Determinant of [PSI⁺], a Heritable Prion-like Factor of *S. cerevisiae*. *Cell* (T. 89).
51. Gsponer, J., Habberthü, U., & Caflisch, A. (2003). The role of side-chain interactions in the early steps of aggregation: Molecular dynamics simulations of an amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35. *PNAS April* (T. 29, Numeris 9). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0835307100
52. Haïk, S., Brandel, J. P., Salomon, D., Sazdovitch, V., Delasnerie-Lauprêtre, N., Laplanche, J. L., Faucheux, B. A., Soubrié, C., Boher, E., Belorgey, C., Hauw, J. J., & Alperovitch, A. (2004). Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt–Jakob disease fails to show significant effects. *Neurology*, 63(12), 2413 LP – 2415. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000148596.15681.4D>

53. Haïk, S., Marcon, G., Mallet, A., Tettamanti, M., Welaratne, A., Giaccone, G., Azimi, S., Pietrini, V., Fabreguettes, J. R., Imperiale, D., Cesaro, P., Buffa, C., Aucan, C., Lucca, U., Peckeu, L., Suardi, S., Tranchant, C., Zerr, I., Houillier, C., ... Tagliavini, F. (2014). Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, *13*(2), 150–158. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70307-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70307-7)
54. Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol* (T. 166).
55. Hasbun, R., Bloch, K. C., & Bhimraj, A. (2021). Neurological complications of some infectious diseases. *Current Clinical Neurology*.
56. Horvath, A., & Riezman, H. (1994). Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *10*(10), 1305–1310. <https://doi.org/10.1002/yea.320101007>
57. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., & Radford, S. E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(12), 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>
58. Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Virology Journal*, 1–8.
59. Jakhria, T., Hellewell, A. L., Porter, M. Y., Jackson, M. P., Tipping, K. W., Xue, W. F., Radford, S. E., & Hewitt, E. W. (2014). B2-Microglobulin Amyloid Fibrils Are Nanoparticles That Disrupt Lysosomal Membrane Protein Trafficking and Inhibit Protein Degradation By Lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(52), 35781–35794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586222>
60. Jakob, A. (1920). *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde*.
61. Jones, G., Song, Y., Chung, S., & Masison, D. C. (2004). *Propagation of Saccharomyces cerevisiae [PSI+] Prion Is Impaired by Factors That Regulate Hsp70 Substrate Binding*. *24*(9), 3928–3937. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.9.3928>
62. Jung, G., Jones, G., Wegrzyn, R. D., & Masison, D. C. (2000). *A Role for Cytosolic Hsp70 in Yeast [PSI+] Prion Propagation and [PSI+] as a Cellular Stress*.
63. Kang, J., Myung, S. L., & Gorenstein, D. G. (2005). The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *Journal of biochemical and biophysical methods*, *64*(2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/J.JBBM.2005.06.003>
64. Karamanos, T. K., Kalverda, A. P., Thompson, G. S., & Radford, S. E. (2015). Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 88–89, 86–104. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2015.05.002>
65. Kim, W., & Hecht, M. H. (2006). *Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's A42 peptide*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605629103
66. Kirsebaum, W. (1924). *Zwei eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems nach Art der spastischen Pseudosklerose (Jakob). Juni 1923*.

67. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
68. Krastanova, O., Hadzhitodorov, M., & Pesheva, M. (2005). Ty elements of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 19, 19–26. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817272>
69. Krzewska, J., & Melki, R. (2006). Molecular chaperones and the assembly of the prion Sup35p, an in vitro study. *EMBO Journal*, 25(4), 822–833. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600985>
70. Kumagai, S., Daikai, T., & Onodera, T. (2019). Bovine Spongiform Encephalopathy – A Review from the Perspective of Food Safety. *Food Safety*, 7(2), 21–47. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2018009>
71. Kushnirov, V. V., Vishnevskaya, A. B., Alexandrov, I. M., & Ter-Avanesyan, M. D. (2007). Prion and Nonprion Amyloids: A Comparison Inspired by the Yeast Sup35 Protein. *Prion*, 1(3), 179. <https://doi.org/10.4161/PRI.1.3.4840>
72. Ladner-Keay, C. L., Ross, L., Perez-Pineiro, R., Zhang, L., Bjorndahl, T. C., Cashman, N., & Wishart, D. S. (2018). A simple in vitro assay for assessing the efficacy, mechanisms and kinetics of anti-prion fibril compounds. *Prion*, 12(5–6), 280–300. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1525254>
73. Lancaster, A. K., Bardill, J. P., True, H. L., & Masel, J. (2010). The spontaneous appearance rate of the yeast prion [PSI⁺] and its implications for the evolution of the evolvability properties of the [PSI⁺] system. *Genetics*, 184(2), 393–400. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.110213>
74. Lebo, K. (2008). *The Driving Forces of Peptide Aggregation: A Study of the Yeast Sup35 Prion Fragment GNNQQNY*. <http://hdl.handle.net/2345/549>
75. Lemarre, P., Pujou-Menjouet, L., & Sindi, S. S. (2020). A unifying model for the propagation of prion proteins in yeast brings insight into the [PSI⁺] prion. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007647>
76. LeVine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2(3), 404–410.
77. Liebman, S. W., & Chernoff, Y. O. (2012). *Prions in Yeast*. 191(August), 1041–1072. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137760>
78. Ling, M. M., & Robinson, B. H. (1997). Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Analytical biochemistry*, 254(2), 157–178. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1997.2428>
79. Linse, S. (2017). Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation. *Biophysical Reviews*, 9(4), 329–338. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0289-z>
80. Lipfert, J., Franklin, J., Wu, F., & Doniach, S. (2005). Protein misfolding and amyloid formation for the peptide GNNQQNY from yeast prion protein sup35: Simulation by reaction path annealing. *Journal of Molecular Biology*, 349(3), 648–658. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.083>
81. Liu, J., Martin-Yken, H., Bigey, F., Dequin, S., François, J. M., & Capp, J. P. (2015). Natural Yeast Promoter Variants Reveal Epistasis in the Generation of Transcriptional-Mediated Noise and Its Potential

- Benefit in Stressful Conditions. *Genome Biology and Evolution*, 7(4), 969–984. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVV047>
82. López De La Paz, M., & Serrano, L. (2003). *Sequence determinants of amyloid fibril formation*. <https://www.pnas.org>
 83. Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., & Gambetti, P. (2009). *Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei*.
 84. Ma, J., & Wang, F. (2011). Prion disease and the „protein-only hypothesis“. *Physiology & behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1042/bse0560181.Prion>
 85. Mahabadi, H. M., & Taghibiglou, C. (2020). Cellular Prion Protein (PrPc): Putative Interacting Partners and Consequences of the Interaction. *Molecular Sciences*.
 86. Mao, X., Ou, M., Karuppagounder, S., Kam, T., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G., Brahmachari, S., Shin, J., Kang, H., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S., Kang, S., Gonçalves, R., Liang, Y., ... Dawson, T. (2017). Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Physiology & behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1126/science.aah3374.Pathological>
 87. Mastrianni, J. A., Nixon, R., Layzer, R., Teling, G. C., Han, D., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1999). *Prion Protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia*.
 88. Matos, A. M., Cristóvão, J. S., Yashunsky, D. V., Nifantiev, N. E., Viana, A. S., Gomes, C. M., & Rauter, A. P. (2017). Synthesis and effects of flavonoid structure variation on amyloid- β aggregation. *Pure and Applied Chemistry*, 89(9), 1305–1320. <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0201>
 89. Matveenko, A. G., Barbitoff, Y. A., Manuela, L., Garcia, J., Chernoff, Y. O., & Zhouravleva, G. A. (2018). Differential effects of chaperones on yeast prions : CURrent view. *Current Genetics*, 64(2), 317–325. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0750-3>
 90. McLaurin, J., Yang, D. S., Yip, C. M., & Fraser, P. E. (2000). Review: Modulating factors in amyloid- β fibril formation. *Journal of Structural Biology* (T. 130, Numeriai 2–3, p. 259–270). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4289>
 91. Meisl, G., Kirkegaard, J. B., Arosio, P., Michaels, T. C. T., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., Linse, S., & Knowles, T. P. J. (2016). Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nature Protocols*, 11(2), 252–272. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.010>
 92. Michelitsch, M. D., & Weissman, J. S. (2000). *A census of glutamineasparagine-rich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions*. www.pnas.org
 93. Monahan, Z. T., Rhoads, S. N., Yee, D. S., & Shewmaker, F. P. (2018). *Yeast Models of Prion-Like Proteins That Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveal Pathogenic Mechanisms*. 11(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00453>
 94. Monsellier, E., & Chiti, F. (2007). Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution. *EMBO Reports* (T. 8, Numeris 8, p. 737–742). <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401034>

95. Morris, K. L., Rodger, A., Hicks, M. R., Debulpaep, M., Schymkowitz, J., Rousseau, F., & Serpell, L. C. (2013). Exploring the sequence-structure relationship for amyloid peptides. *Biochemical Journal*, *450*(2), 275–283. <https://doi.org/10.1042/BJ20121773>
96. Mukherjee, M., Nandi, A., Chandra, K., Saikia, S. K., Jana, C. K., & Das, N. (2020). Protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae* at different growth phases. *Journal of Microbiological Methods*, *172*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105906>
97. Nakagawa, Y., Shen, H. C. H., Komi, Y., Sugiyama, S., Kurinomaru, T., Tomabechei, Y., Krayukhina, E., Okamoto, K., Yokoyama, T., Shirouzu, M., Uchiyama, S., Inaba, M., Niwa, T., Sako, Y., Taguchi, H., & Tanaka, M. (2022). Amyloid conformation-dependent disaggregation in a reconstituted yeast prion system. *Nature Chemical Biology* *2022* *18*:3, *18*(3), 321–331. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00951-y>
98. Nawawi, O., Abdullah, M. P., & Yusuf, C. Y. L. (2022). A strategy for in-house production of a positive selection cloning vector from the commercial pJET1.2/blunt cloning vector at minimal cost. *3 Biotech*, *12*(9), 1–5. <https://doi.org/10.1007/S13205-022-03289-X/FIGURES/2>
99. Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riek, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). *Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils*. www.nature.com/nature.
100. Nevzglyadova, O. V., Kuznetsova, I. M., Mikhailova, E. V., Artamonova, T. O., Artemov, A. V., Mittenberg, A. G., Kostyleva, E. I., Turoverov, K. K., Khodorkovskii, M. A., & Soidla, T. R. (2011). *The effect of red pigment on the amyloidization of yeast proteins*. *May*, 505–526. <https://doi.org/10.1002/yea>
101. Olzscha, H., Schermann, S. M., Woerner, A. C., Pinkert, S., Hecht, M. H., Tartaglia, G. G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U., & Vabulas, R. M. (2011). Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell*, *144*(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.050>
102. Osherovich, L. Z., Cox, B. S., Tuite, M. F., & Weissman, J. S. (2004). Dissection and design of yeast prions. *PLoS Biology*, *2*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020086>
103. Otto, M., Cepek, L., Ratzka, P., Doehlinger, S., Boekhoff, I., Wiltfang, J., Irle, E., Pergande, G., Ellers-Lenz, B., Windl, O., Kretschmar, H. A., Poser, S., & Prange, H. (2004). Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD. *Neurology*, *62*(5), 714 LP – 718. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000113764.35026.EF>
104. Panja, S., Saha, S., Jana, B., & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology*, *127*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.008>
105. Park, S., Wang, X., Xi, W., Richardson, R., Laue, T. M., & Denis, C. L. (2022). The non-prion SUP35 preexists in large chaperone-containing molecular complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *90*(3), 869–880. <https://doi.org/10.1002/PROT.26282>
106. Pen˜a, M. M. O., Koch, K. A., & Thiele, D. J. (1998). Dynamic Regulation of Copper Uptake and Detoxification Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (T. 18, Numeris 5).

107. *Prion Diseases* | Johns Hopkins Medicine. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužēs 26 d., <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/prion-diseases>
108. *Prion Diseases* | Memory and Aging Center. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužēs 26 d., <https://memory.ucsf.edu/dementia/rapidly-progressive-dementias/prion-diseases>
109. *PRNP gene: MedlinePlus Genetics*. (s.a.). Gauta 2024 m. gegužēs 26 d., <https://medlineplus.gov/genetics/gene/prnp/>
110. Reches, M., Porat, Y., & Gazit, E. (2002). Amyloid fibril formation by pentapeptide and tetrapeptide fragments of human calcitonin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35475–35480. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206039200>
111. Richardson, E. P. J., & Masters, C. L. (1920). *The Nosology of Creutzfeldt-Jakob Disease and Conditions Related to the Accumulation of PrPcJD in the Nervous System*. 41(1 995), 33–41.
112. Sasnauskas, K. (2006). *Genų inžinerijos pagrindai*.
113. Schneiter, R. (2004). Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast. *Trends in Genetics, January*. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90180-7](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90180-7)
114. Scott, K. A., Williams, S. A., & Santangelo, T. J. (2021). Thermococcus kodakarensis provides a versatile hyperthermophilic archaeal platform for protein expression. *Methods in enzymology*, 659, 243. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2021.06.014>
115. Sharma, A., McDonald, M. A., Rose, H. B., Chernoff, Y. O., Behrens, S. H., & Bommarius, A. S. (2021). Modeling Amyloid Aggregation Kinetics: A Case Study with Sup35NM. *Journal of Physical Chemistry B*, 125(19), 4955–4963. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.0C11250/ASSET/IMAGES/LARGE/JPOC11250_0008.JPEG
116. Shida, T., Kamatari, Y. O., Yoda, T., Yamaguchi, Y., Feig, M., Ohhashi, Y., Sugita, Y., Kuwata, K., & Tanaka, M. (2020). Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion. *Nature Chemical Biology* 2020 16:7, 16(7), 756–765. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0516-y>
117. Sicorello, A., Torrassa, S., Soldi, G., Gianni, S., Travaglini-Allocatelli, C., Taddei, N., Relini, A., & Chiti, F. (2009). Agitation and high ionic strength induce amyloidogenesis of a folded PDZ domain in native conditions. *Biophysical Journal*, 96(6), 2289–2298. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.042>
118. Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). *Other animal prion diseases*. 199–212. <https://doi.org/10.1093/bmb/dg66.199>
119. Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in Saccharomyces Cerevisiae. *Genetics*, 122(1), 19. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/122.1.19>
120. Soto, C., & Satani, N. (2012). The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Bone*, 78(2), 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.09.001>.The
121. Sporn, Z. A., & Hines, J. K. (2015). *Hsp40 function in yeast prion propagation: Amyloid diversity necessitates chaperone functional complexity*. 80–89. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1020268>
122. Street, A. G., & Mayo, S. L. (1999). Intrinsic-sheet propensities result from van der Waals interactions between side chains and the local backbone. *Biophysics* (T. 96, Numeris 144). www.pnas.org.

123. Ter-Avanesyan, M. D., Kushnirov, V. V., Dagkesamanskaya, A. R., Didichenko, S. A., Chernoff, Y. O., Inge-Vechtomov, S. G., & Smirnov, V. N. (1993). Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Molecular Microbiology*, *7*(5), 683–692. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1993.TB01159.X>
124. Tessier, P. M., & Lindquist, S. (2009). Unraveling infectious structures, strain variants and species barriers for the yeast prion [PSI⁺]. *Methods Molecular Biology*, *176*(5), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1617.Unraveling>
125. Thiele, D. J. (1988). ACE] Regulates Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Metallothionein Gene. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (T. 8, Numeris 7).
126. Tipping, K. W., Karamanos, T. K., Jakhria, T., Iadanza, M. G., Goodchild, S. C., Tuma, R., Ranson, N. A., Hewitt, E. W., & Radford, S. E. (2015). pH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(18), E5691–E5696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423174112>
127. Toyama, B. H., Kelly, M. J. S., Gross, J. D., & Weissman, J. S. (2007). The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature*, *449*(7159), 233–237. <https://doi.org/10.1038/nature06108>
128. Tuite, M. F., & Serio, T. R. (2010). The prion hypothesis: From biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(12), 823–833. <https://doi.org/10.1038/nrm3007>
129. Uckert, W., Pedersen, L., & Günzburg, W. (2000). Green fluorescent protein retroviral vector : generation of high-titer producer cells and virus supernatant. *Methods in molecular medicine*, *35*, 275–285. <https://doi.org/10.1385/1-59259-086-1:275>
130. Uttara, B., Singh, A. V, Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Medical Electron Microscopy*, *34*(2), 92–102. <https://doi.org/10.1007/s007950170003>
131. Wang, Z. (2006). Gene Expression and Extract Preparation in Yeast Controlled Expression of Recombinant Genes and Preparation of Cell-Free Extracts in Yeast. *From: Methods in Molecular Biology* (T. 313).
132. Wetzel, R. (2006). Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly. *Accounts of Chemical Research* (T. 39, Numeris 9, p. 671–679). <https://doi.org/10.1021/ar050069h>
133. Wickner, R. B. (1996). Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, *30*(Table 1), 109–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.109>
134. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Son, M., Wu, S., & Niznikiewicz, M. (2020). How Do Yeast Cells Contend with Prions? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13), 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134742>
135. Wickner, R. B., Shewmaker, F., Edskes, H., Kryndushkin, D., Nemecek, J., McGlinchey, R., Bateman, D., & Winchester, C. L. (2010). Prion amyloid structure explains templating: how proteins can be genes. *FEMS Yeast Research*, *10*(8), 980–991. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2010.00666.X>
136. Wickner, R. B., Shewmaker, F. P., Bateman, D. A., Edskes, H. K., Gorkovskiy, A., Dayani, Y., & Bezsonov, E. E. (2015). Yeast Prions: Structure, Biology, and Prion-Handling Systems. *Microbiology*

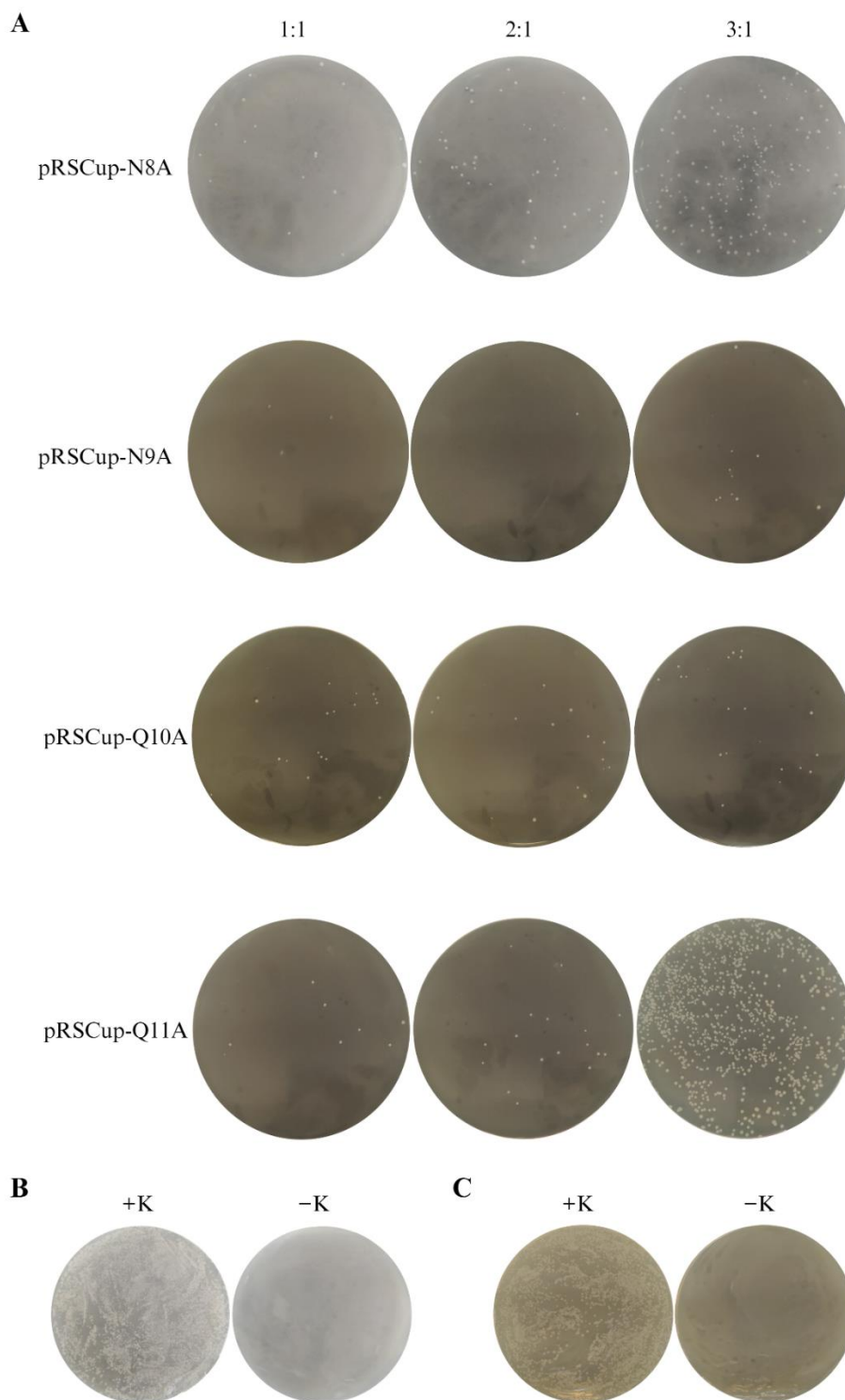
- and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 1–17. https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-14/SUPPL_FILE/ZMR999092378SO1.PDF
137. Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. (1990). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, 921–925.
138. Williams, E. S., & Young, S. (1980). *Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiformencephalopathy*. 16(1).
139. Winkler, J., Tyedmers, J., Bukau, B., & Mogk, A. (2012). *Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation*. 198(3), 387–404. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201074>
140. Winship, P. R. (1989). An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic acids research*, 17(3), 1266. <https://doi.org/10.1093/NAR/17.3.1266>
141. Wurth, C., Guimard, N. K., & Hecht, M. H. (2002). Mutations that reduce aggregation of the alzheimer^oFs A β 42 peptide: An unbiased search for the sequence determinants of A β amyloidogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 319(5), 1279–1290. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00399-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00399-6)
142. Zhang, Y., Man, V. H., Roland, C., & Sagui, C. (2016). Amyloid Properties of Asparagine and Glutamine in Prion-like Proteins. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(5), 576–587. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.5B00337/ASSET/IMAGES/CN-2015-00337F_M003.GIF
143. Zhang, L., & Vijg, J. (2018). Somatic Mutagenesis in Mammals and Its Implications for Human Disease and Aging. *Annual review of genetics*, 52, 397. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-120417-031501>
144. Zhang, T., Lei, J., Yang, H., Xu, K., Wang, R., & Zhang, Z. (2011). An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(11), 795–798. <https://doi.org/10.1002/yea.1905>
145. Zhang, Z., Chen, H., Bai, H., & Lai, L. (2007). Molecular dynamics simulations on the oligomer-formation process of the GNNQQNY peptide from yeast prion protein Sup35. *Biophysical Journal*, 93(5), 1484–1492. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.100537>
146. Zheng, J., Ma, B., Tsai, C. J., & Nussinov, R. (2006). Structural stability and dynamics of an amyloid-forming peptide GNNQQNY from the yeast prion sup-35. *Biophysical Journal*, 91(3), 824–833. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.083246>
147. Žvingila, D. (2008). *Rekombinogenezė*. Technologija.

PRIEDAI

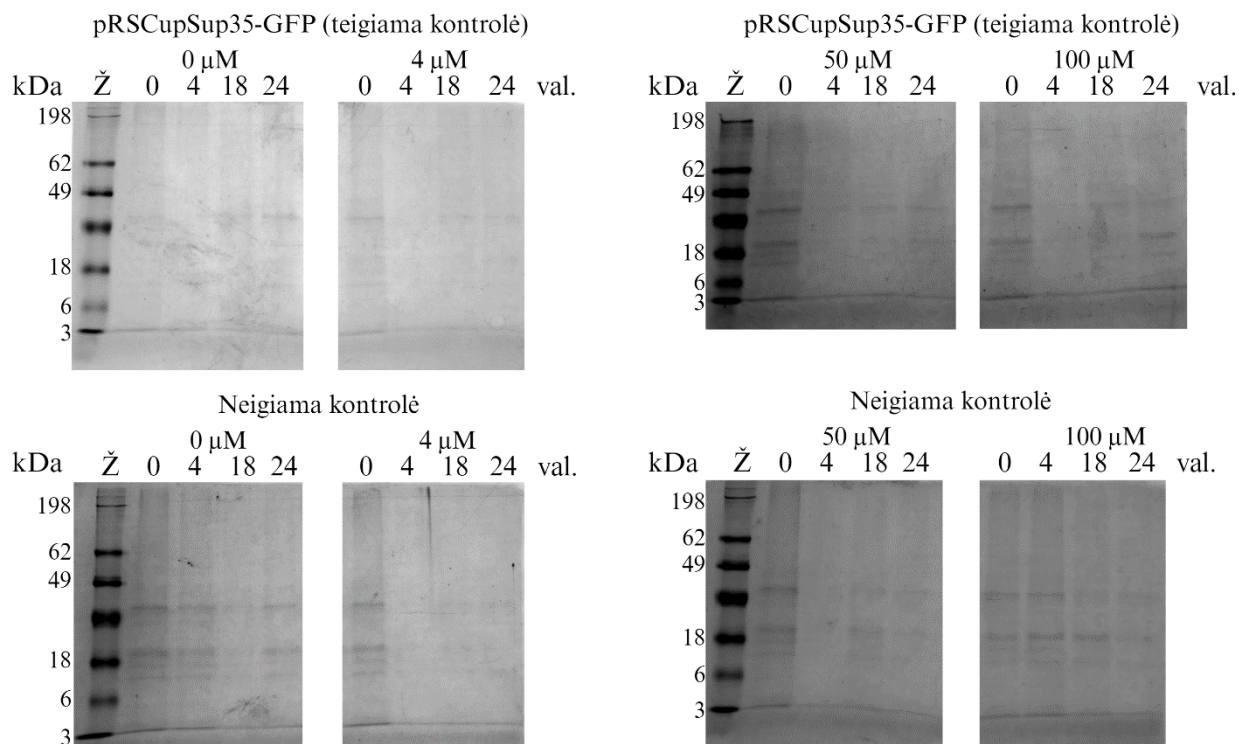
1 priedas

1.1 lentelė. Prioninių ligų kilmė žinduoliuose (pagal [1] Creutzfeldt, 1920; [2] Jakob, 1920; [3] Richardson ir Masters, 1920; [4] Kirschbaum, 1924; [5] Williams ir Young, 1980; [6] Will ir kt., 1990; [7] Bons ir kt., 1999; [8] Mastrianni ir kt., 1999; [9] Sigurdson & Miller, 2003; [10] Aguzzi, 2006; [11] Gambetti ir kt., 2009; [12] Lugaresi ir kt., 2009; [13] Gajdusek ir Zigas, 2010; [14] Imran ir Mahmood, 2011; [15] Babelhadj ir kt., 2018).

Gyvūnų prioninės ligos				
Liga	Šeimininkas	Kilmė	Atrasta	Šaltinis
Skrepi	Avys, ožkos	Nežinoma	18 a. vidurys	[10, 14]
Transmisinė audinių encefalopatija (TAE)	Audinės	Avių arba galvijų kilmės	1947 m.	[9, 14]
Lėtinė elnių išsekimo liga (LEIL)	Elniai	Nežinoma	1967 m.	[5, 9, 14]
Galvijų spongiforminė encefalopatija (GSE)	Galvijai	Nežinoma	1986 m.	[15]
Egzotinių kanopinių encefalopatija	Nijala, kudu	GSE kilmės	1986 m.	[15]
Kačių spongiforminė encefalopatija	Katės	GSE kilmės	1990 m.	[15]
Nežmoginių primatų ligos	Lemūrai	GSE kilmės	1996 m.	[7, 14]
Kupranugarių prioninė liga (KPL)	Vienakupriai kupranugariai	Nežinoma	2016 m.	[16]
Žmonių prioninės ligos				
Liga	Šeimininkas	Kilmė	Atrasta	Šaltinis
Kuru	Žmogus	Ritualinis kanibalizmas	1957 m.	[13]
Sporadinė Creutzfeldt-Jakob liga (sCJL)	Žmogus	Spontaniška PrP ^C → PrP ^{Sc} konversija arba somatinė mutacija	1920 m.	[1, 2, 14]
Šeiminė/genetinė CJL	Žmogus	Mutacija <i>PRNP</i> gene	1924 m.	[4, 14]
Gerstmann-Sträussler-Scheinker sindromas (GSSS)	Žmogus	Mutacija <i>PRNP</i> gene	1936 m.	[3]
Jatrogeninė CJL (jCJL)	Žmogus	Infekcija žmogaus kilmės prionais, ragenos transplantatais, dura mater	1974 m.	[14]
Mirtina šeiminė nemiga (MŠN)	Žmogus	<i>PRNP</i> haplotipas 178N-129M	1986 m.	[12]
Variantinė CJL (vCJL)	Žmogus	GSE kilmės	1996 m.	[6]
Sporadinė mirtina nemiga	Žmogus	Spontaniška PrP ^C → PrP ^{Sc} konversija arba somatinė mutacija	1999 m.	[8]
Prionopatija su kintamu jautrumu proteazėms (VPSPr)	Žmogus	Spontaniška PrP ^C → PrP ^{Sc} konversija arba somatinė mutacija	2008 m.	[11]



1 pav. Ant kietos LB^{+amp} terpės užaugusios ląstelių kolonijos po cheminės *E. coli* DH5 α transformacijos su pRSCup-N8A, pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriais. A – pavaizduotos po cheminės transformacijos užaugusios ląstelių kolonijos, kurios buvo transformuotos atitinkamai nurodytais vektoriais; pateikti 1:1, 2:1 ir 3:1 santykiai nurodo ligavimo reakcijai naudotus inserto:vektoriaus kiekius. B – teigiama (+K) ir neigiama (-K) kontrolės, naudotos atliekant transformaciją su pRSCup-N8A vektoriumi; +K naudota pRSCupSup35GFP plazmidė, turinti natyvų *SUP35GFP* geną, o -K – ląstelės nebuvo inkubuotos su vektoriumi. C – teigiama (+K) ir neigiama (-K) kontrolės, naudotos atliekant transformaciją su pRSCup-N9A, pRSCup-Q10A ir pRSCup-Q11A vektoriais; +K naudota pRSCupSup35-GFP plazmidė, turinti natyvų *SUP35-GFP* geną, o -K – ląstelės nebuvo inkubuotos su vektoriumi.



2 pav. *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*]⁻[*PIN*⁺] kamieno ląstelių, turinčių pRSCupSup35-GFP vektorių (teigiama kontrolė) arba neturinčių jokio vektoriaus (neigiama kontrolė), baltymų analizė NDS-PAGE metodu. Ž – baltymų dydžio žymeklis SeeBlue[®] Prie-Stained Protein Standard. Pateikti po indukcijos iš surinktų ląstelių išskirti baltymai. Ląstelių mėginiai buvo surenkami 0 val. ir po 4 val., 18 val. ir 24 val. Tyrimo metu terpės, kuriose buvo kultivuojamos mielių ląstelės, turinčios pRSCupSup35-GFP arba neturinčios jokio vektoriaus, buvo papildomos induktoriais (vario sulfato tirpalas) iki galutinės 15–100 μM koncentracijos.

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovei lekt. Justinai Versockienei už suteiktą galimybę atlikti mokslinį darbą, už diskusija, patarimus ir pagalbą rengiant magistro baigiamąjį darbą.

Noriu padėkoti ir VU Gyvybės mokslų centro, Biomokslų instituto direktorei prof. Eglei Lastauskienei už galimybę darbą atlikti Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijoje.

Labai ačiū visiems laboratorijos kolegoms, kurie visuomet padėjo, kai tik reikėjo pagalbos. Ačiū už visus pokalbius, praleistą laiką, palaikymą, rūpestį ir užsimezgasias draugystes.