

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

IEVA JANKAUSKAITĖ

Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

**MIELIŲ BALTYMO SUP35 MUTANTINIO VARIANTO K102R KŪRIMAS
IR JO SINTEZĖ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LĄSTELĖSE**

Darbo vadovė J. Versockienė

Vilnius, 2024

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Žinduolių prionai ir prioninės ligos.....	8
1.1.1. Prioninių ligų ir mielių prionų sąsaja su amiloidinėmis žmonių ligomis (Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ligos).....	8
1.2. <i>S. cerevisiae</i> ir mielių prionai.....	10
1.2.1. Mielės – modelinė sistema tiriant prionus.....	10
1.2.2. Mielių prionų savybės	11
Prionų funkcijos praradimo (angl. <i>loss-of-function</i>) fenotipas.....	11
Prionai paveldimi ne mendeliniu būdu	11
Grižtamas prionų pašalinimas.....	12
Prionų formavimasis <i>de novo</i>	12
Hsp baltymų įtaka prionų agregacijai normaliomis ir streso sąlygomis bei <i>de novo</i> prionų formavimuisi.....	13
1.3. Sup35 baltymas ir jo prioninė forma [<i>PSI</i> ⁺].....	14
1.3.1. Sup35 baltymo struktūra.....	15
1.3.2. Sup35 ir baltymų transliacija.....	17
1.3.3. Sup35 baltymo prioninė forma [<i>PSI</i> ⁺].....	18
1.3.4. [<i>PSI</i> ⁺] amiloido formavimasis.....	20
1.4. Ubikvitilimas.....	22
1.4.1. Ubikvitinas, ubikvitilimo tipai ir deubikvitilimas.....	22
1.4.2. Proteosoma.....	24
1.4.3. Prionai, jų ubikvitilimas ir degradacija proteosomoje	25
1.4.4. Kodėl argininas keičia liziną?	26
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	29
2.1. Naudotos medžiagos.....	29
2.1.1. Reagentai	29
2.1.2. Mielių ir bakterijų kamienai, naudoti kaip rekombinantinės DNR recipientai	31
2.1.3. Plazmidės.....	31
2.1.4. Terpės ir tirpalai.....	31
2.1.5. Naudoti prietaisai ir įranga.....	32
2.1.6. Pradmenys	33
2.2. Tyrimo metodai	34
2.2.1. Plazmidinės DNR skyrimas	34
2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje	34
2.2.3. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio.....	34
2.2.4. Vietai specifinė mutagenezė	35
2.2.5. DNR restrikcija endonukleazėmis.....	37
2.2.6. Tikslinio geno įterpimas į klonavimo vektorių.....	37
2.2.7. pJET1.2/bluntSup35K102RGFP perkėlimas į kompetentines <i>E. coli</i> DH5α bakterijas cheminės transformacijos metodu.....	38
2.2.8. Tikslinio geno įterpimas į pRSCup „šaudyklinį“ vektorių.....	38

2.2.9. pRSCupSup35K102RGFP perkėlimas į kompetentines <i>E. coli</i> DH5α bakterijas cheminės transformacijos metodu	39
2.2.10. Bakterijų kolonijų PGR.....	39
2.2.11. Kompetentinių <i>S. cerevisiae</i> 74-D694 [<i>psi</i> ⁻][<i>PIN</i> ⁺] kamieno mielių ląstelių paruošimas ir cheminė transformacija.....	40
2.2.12. Mielių kolonijų PGR.....	40
2.2.13. Mėginių paruošimas sekoskaitai	41
2.2.14. Tikslinio baltymo sintezės indukcija vario jonais <i>S. cerevisiae</i> 74-D694 [<i>psi</i> ⁻][<i>PIN</i> ⁺] kamieno mielių ląstelėse.....	42
2.2.15. Visų mielių ląstelės baltymų skyrimas šarminės lizės metodu.....	42
2.2.16. Mielių ląstelių baltymų analizė elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (NDS-PAGE)	43
3. REZULTATAI	44
3.1. Vietai specifinė mutagenezė.....	44
3.2. Tikslinio geno įterpimas į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt ir perkėlimas į chemiškai kompetentines <i>E. coli</i> DH5α bakterijas	45
3.3. Tikslinio geno įterpimas į pRSCup „šaudyklinį“ mielių vektorių ir transformacija į chemiškai kompetentines <i>E. coli</i> DH5α ląsteles	48
3.4. Mielių kolonijų PGR	50
3.5. Sekoskaitos rezultatai	53
3.6. Mielių ląstelių baltymų analizė elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (NDS-PAGE).....	54
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	57
IŠVADOS	60
SANTRAUKA	61
SUMMARY	62
ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS.....	63
PADĖKA.....	64
LITERATŪROS SĄRAŠAS	65
PRIEDAI.....	77

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- ADE** – adeninas;
- AIR** – angl. *Aminoimidazole ribotide* – aminoimidazolo ribotidas;
- APS** – angl. *Ammonium persulphate* – amonio persulfatas;
- ARS** – angl. *Autonomously replicating sequence* – autonomiškai besireplikuojanti seka;
- ATP** – angl. *Adenosine triphosphate* – adenzino trifosfatas;
- CAP** – angl. *Catabolic activator protein* – katabolinis aktyvuojantis baltymas;
- CP** – angl. *Core particle* – šerdies dalis;
- DMSO** – angl. *Dimethyl sulfoxide* – dimetilsulfoksidas;
- DUB** – angl. *Deubiquitinating enzymes (DUBs)* – deubikvitininantys fermentai;
- E1 / 2 / 3** – angl. *Enzyme 1 / 2 / 3* – fermentas 1 / 2 / 3;
- EDTA** – angl. *Ethylenediaminetetraacetic acid* – etilendiamintetraacto rūgštis;
- eRF** – angl. *Eukaryotic release factor* – eukariotinis atpalaidavimo veiksnys;
- FW** – angl. *Forward* – tiesioginis;
- GC** – guanino ir citozino kiekis;
- GFP** – angl. *Green fluorescent protein* – žalias fluorescuojantis baltymas;
- GuHCl** – guanidino hidrochloridas;
- Hsp** – angl. *Heat shock proteins* – karščio šoko baltymai;
- YNB** - angl. *Yeast nitrogen base* – mielių azoto bazė;
- YPD** – angl. *Yeast extract-peptone-dextrose* – mielių ekstrakto, peptono ir dekstrozės terpė;
- IPTG** – angl. *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* – izopropilo-β-D-tiogalaktopiranozidas;
- LB** – angl. *Lysogeny broth* – lizogeninė mitybinė terpė;
- NDS-PAGE** – angl. *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE* – elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu;
- OR** – angl. *Oligopeptide repeats* – oligopeptidiniai pasikartojimai;
- PABP** – angl. *Poly(A)-binding protein* – su poli(A) surišantis baltymas;
- PEG4000** – polietilenglikolis, kurio molinė masė 4000;
- PFF** – angl. *Pre-formed fibrils* – iš anksto suformuotos fibrilės;
- PK** – angl. *Proteinase K* – proteinazė K;
- PrD** – angl. *Prion domain* – prionizacijos domenai;
- PrP** – angl. *Prion protein or protease-resistant protein* – priono baltymas arba proteazei atsparus baltymas;
- PrP^{Sc}** – angl. *Prion protein scrapie* – skrepi ligos priono baltymas (pakitusios struktūros);
- Q** – glutaminas;

QN – glutaminas ir asparaginas;

RP – angl. *Regulatory particle* – reguliacinė dalis;

RV – angl. *Reverse* – atvirkštinis;

SAICAR – angl. *(2S)-2-[[5-amino-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(phosphonooxymethyl)oxolan-2-yl]imidazole-4-carbonyl]amino]butanedioic acid* – (2S)-2-[[5-amino-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroksi-5-(fosfonooksimetil)oksolan-2-yl]imidazolo-4-karbonil]amino] butanedoininė rūgštis;

SC – angl. *Synthetic complete medium* – sintetinė turtinga terpė;

TAE – angl. *Tris-acetate-EDTA*, TAE – tris-acetato-EDTA buferinis tirpalas;

T_m – angl. *Melting temperature* – lydymosi temperatūra;

TEMED – angl. *Tetramethylethylenediamine* – tetrametiletilendiaminas;

Tris – angl. *Tris(hydroxymethyl)aminomethane* – tris–(hidroksimetil) aminometanas;

TSE – angl. *Transmissible spongiform encephalopathies* – transmisinės spongiforminės encefalopatijos;

UBC4 – angl. *Ubiquitin conjugating enzyme E2 4* – ubikvitiną jungiantis fermentas E2 4;

UV – ultravioletiniai spinduliai;

α -syn – angl. *α -synuclein* – α -sinukleinas;

Δ – delecija.

IVADAS

Prionai yra pakitusios, infekcinės, natyvių, funkcionalių baltymų formos, galinčios įgyti naujas funkcijas arba prarasti senąsias. Šios baltymų formos yra linkusios agreguotis, savime daugintis bei plisti. Žinduoliuose prionai yra perduodami ekstraląstelinio būdu, o žemesniuose eukariotuose, pavyzdžiui, mielėse – paveldimi per citoplazmą. Prionai patraukė tyrėjų dėmesį dėl sukeliama neurodegeneratyvinių ligų žinduolių bei žmonių organizmuose. Dauguma jų yra užkrečiamos ligos, transmisinės spongiforminės encefalopatijos (angl. *transmissible spongiform encephalopathies*, toliau TSE), siejamos su priono baltymu arba proteazei atspariu baltymu (angl. *prion protein or protease-resistant protein*, toliau PrP), koduojamu *PRNP* (angl. *prion protein*) geno. Kadangi daugiau nei 30 žmonių ligų, tokių kaip Alzheimerio ir Parkinsono ligos, asocijuojamos su įvairių baltymų amiloidų formavimusi, prionų tyrimai gali leisti atrasti naujas šių ligų gydymo strategijas.

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra tinkamas modelinis organizmas ne tik dėl ląstelių mechanizmų panašumo į aukštesniųjų eukariotų, universalios DNR transformacijos sistemos ir aiškiai apibrėžtos genetinės sistemos, bet ir todėl, kad mielėse nustatyta bent 10 skirtingų prioninių domenų. Be to, amiloidų formavimosi ir plitimo sistemos bei prionų pašalinimo būdai, manoma, gali būti pritaikyti žmonių amiloidinėms sistemoms analizuoti. Vienas iš geriausiai ištirtų mielių prionų yra Sup35 baltymo prionas [*PSI*⁺], tapęs modeliniu dėl plačiai ištirto priono formavimosi, agregacijos, pašalinimo, plitimo ir sąveikų su kitais prioniniais baltymais.

Sup35 baltymas yra svarbus baltymų transliacijos terminacijoje, o jo virtimas prionu mažina šio proceso efektyvumą. Tai, kad prionai yra atsparūs įvairiems eliminavimo veiksniams – karščiui, jonizuojančiai spinduliuotei, formaldehidui bei proteazėms – skatina ieškoti to priežasčių ir galimų šios problemos sprendimo būdų. Išsiaiškinta, kad *in vivo* Sup35 baltymas yra prieinamas proteazėms, tačiau atsparumą degradacijai ypatingai lemia aminorūgščių išsidėstymas ir jų savybės. Yra žinoma, jog dažniausiai tam, kad viduląsteliniai baltymai būtų nukreipti į proteosomą degradacijai, jie turi būti ubikvitilinti, o ubikvitiliniami dažniausiai yra baltymo N galo (domeno) lizinai. Todėl šio darbo eigoje vienintelis lizinas prioniniame Sup35 baltymo N domene keičiamas į argininą vietai specifinės mutagenezės metodu.

Darbo tikslas: sukurti Sup35 baltymo mutantinį K102R variantą ir įvertinti jo sintezę *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

1. Įvesti tikslinę K102R aminorūgšties pakaitą Sup35 baltymo gene, taikant persidengiančių fragmentų ilginimo PGR metodą.
2. *SUP35K102R* įliguoti į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt ir transformuoti *E. coli* DH5α kamieno ląsteles.
3. *SUP35K102R* įliguoti į „šaudyklinį“ mielių raiškos vektorių pRSCup ir transformuoti *E. coli* DH5α ir *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamienų ląsteles.
4. Įvertinti natyvaus ir mutantinio Sup35 baltymo varianto K102R sintezę *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Prionai yra savaime besidauginančios infekcinės baltymų formos, galinčios agreguotis, savaime daugintis ir įgyti naujų funkcijų ar prarasti senąsias. Žinduoliuose jie plinta tarpląstelinės infekcijos būdu, o žemesniuose eukariotuose, pvz., mielėse – paveldimi per citoplazmą.

1.1. Žinduolių prionai ir prioninės ligos

Prionai yra identifikuojami kaip neurodegeneratyvinių ligų – žmonių Krocifeldo-Jakobo ligos (angl. *Creutzfeldt-Jakob disease*), galvijų spongiforminės encefalopatijos ir skrepi ligos (angl. *scrapie*) – sukėlėjai (Prusiner, 1982). Šios ligos bendrai yra vadinamos TSE ir yra mirtinos (Wickner et al., 2015). Pakitusi natyvaus ląstelinio žinduolių baltymo PrP^c (angl. *prion protein cellular* – ląstelinis priono baltymas) prioninė forma yra PrP^{Sc} (angl. *prion protein scrapie* – skrepi ligos priono baltymas). Tai vienintelis iki šiol identifikuotas prionas, kuris sukelia ligas žmonėms ir kitiems žinduoliams. PrP^{Sc} yra infekcinis baltymas, nes natyvaus baltymo formą gali priversti įgauti patogeninę konformaciją (Liebman ir Chernoff, 2012). PrP^{Sc} generuoja agregatų (vadinamų amiloidais) susiformavimą infekuotų gyvūnų ir žmonių smegenyse. Be to, lyginant su natyvaus baltymo, PrP^{Sc} antrinėje struktūroje padaugėja β klosčių (Prusiner, 1982).

1.1.1. Prioninių ligų ir mielių prionų sąsaja su amiloidinėmis žmonių ligomis (Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ligos)

Nors dauguma klasikinių žinduolių prioninių ligų yra TSE, tačiau įrodyta, jog amiloidinių ligų, tokių kaip Alzheimerio ar Parkinsono, charakteristikos yra panašios į prionų (Luk et al., 2012). Šios ligos siejamos su įvairių baltymų (nei vienas jų nėra PrP), specifinių kiekvienai ligai, amiloidų ar į amiloidus panašių fibrilių formavimusi (Prusiner, 2012). Kaip ir prionai, didžioji dalis šių patogeninių baltymų plinta ląsteliniam lygyje ir eksperimentinėmis sąlygomis kai kurie iš jų gali būti perduodami organizmo lygmenyje.

Dauguma amiloidinių ligų (amiloidozijų) yra mirtinos ir neišgydomos. Genetines amiloidines ligas sukelia mutacijos, pvz., poliglutamino sritis (angl. *polyQ stretch*) baltyme hantingine, Hantingtono ligos atveju. Alzheimerio ir Parkinsono ligos yra idiopatinės (neaiškios ar nežinomos kilmės), atsirandančios sporadiškai (Chernova et al., 2014).

Žinoma, kad α-sinukleinas (angl. *α-synuclein*, toliau α-syn) yra viena pagrindinių molekulių, dalyvaujančių Parkinsono ligos ir su ja susijusių sutrikimų, sinukleinopatijų, patogenezėje (Forloni, 2023). 2023 metais Meng ir kolegos į transgeninių TgA53T arba laukinio tipo pelių smegenis sušvirkštė iš anksto suformuotas natyvaus Sup35 arba mutoto Sup35 (negalinčio agreguotis, dėl pašalintos priono sekos, kurią apima 7–13 aminorūgštys) fibriles (angl. *pre-formed fibrils*, toliau

PFF) (Meng et al., 2023). PFF yra naujas įrankis, skirtas tirti neurodegeneracines ligas. Fibrilės yra sukuriamos *in vitro* ir gali veiksmingai imituoti endogeninę baltymų agregaciją ląstelių ir gyvūnų modeliuose (ACROBiosystems, 2023). Meng ir kolegų atliktas tyrimas įrodė, kad *S. cerevisiae* infekcija per nosį pagreitina TgA53T pelių α -syn patologijos progresavimą. Sup35 sąveikauja su α -syn ir skatina jo agregaciją. Kai natyvaus Sup35 PFF sušvirkštos į laukinio tipo pelių smegenis, pastebėta akivaizdi α -syn patologija ir pasireiškė pelių motorikos sutrikimai. Sup35 *cross-seeding* būdu „pasėja“ α -syn ir susidaro S- α -syn PFF, pasižyminčios didesniu „pasisėjimo“ aktyvumu ir neurotoksiškumu tiek *in vitro*, tiek *in vivo* (**plačiau apie *cross-seeding* modelį žr. į 1.3.3 skyrių**). Mutuotas Sup35 įtakos α -syn patologijos progresavimui neturėjo (Meng et al., 2023).

Taigi, į prionų panašus α -syn agregatų perdavimas ir plitimas atlieka pagrindinį funkciją vystantis ir progresuojant Parkinsono ligai. Tačiau veiksniai, dėl kurių smegenyse prasideda α -syn agregacija, iš esmės dar nežinomi. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad Sup35 gali būti vienas iš galimų α -syn agregacijos moduliatorių. Nustatyta, kad Sup35 yra Parkinsono liga sergančių pelių smegenų pjūviuose ir kolokalizuoja su α -syn, tačiau vis dar nežinoma, ar žmogaus smegenyse randamas Sup35 yra priono pavidalo (Meng et al., 2023).

Panašūs tyrimai buvo atlikti ir su tau baltymo agregatais, kurie yra Alzheimerio ligos požymis. Flach ir kolegos, prie tirpaus tau baltymo, pridėjo nedidelį agreguoto Sup35NM priono domeno fibrilių kiekį, o tai paskatino tau fibrilių formavimąsi. Sup35NM priono domeno indukuotos tau fibrilės skyrėsi nuo tau fibrilių, kurios susidaro nesant Sup35NM, o tai rodo tiesioginę mielių priono sąveiką su tirpiu tau baltymu. Taigi, mielių prionų agregatai ne tik pagreitina tau agregaciją, bet ir lemia morfologiškai skirtingas tau fibrilių atmainas. Be to, Sup35NM mielių prionų fibrilių inokuliacija į tau transgeninių pelių P301S smegenis išryškino tau patologiją injekcijos vietoje, todėl pirmą kartą įrodyta, kad tau gali „pasėti“ ne žinduolių prionas. Tyrimo išvados parodė, kad ne žinduolių prionas gali moduluoti tau agregaciją, vykstančią Alzheimerio ligos ir kitų tauopatijų patogenezėje (Flach et al., 2022).

Svarbu paminėti, kad Alzheimerio liga yra šešta dažniausiai pasitaikanti mirties priežastis, o šios ir kitų amiloidozių priklausomybė nuo amžiaus prognozuoja tolesnę sveikatos priežiūros išlaidų augimą senstant žmonių populiacijai (Chernova et al., 2014). Tačiau taip pat pažymėtina, kad žinduolių prionus tirti sudėtinga, nes sunku sukurti sąlygas, leidžiančias baltymams tapti infekciniais (Clarke et al., 2001; McKinley et al., 1983; Prusiner et al., 1983). Dėl to besiplečiantis prioninių ligų suvokimas didina mielių prionų tyrimų svarbą. Tiriant kai kurias iš daugelio priemonių, stabdančių mielių prionų dauginimąsi, galima atrasti analogiją arba homologiją su žmogaus sistemomis, o tai gali leisti sukurti perspektyvias amiloidinių žmonių ligų gydymo strategijas (Wickner et al., 2015).

1.2. *S. cerevisiae* ir mielių prionai

Mielės *S. cerevisiae* yra vienaląsčiai grybai, kurie paskutinius du dešimtmečius yra naudojami kaip modelinis organizmas molekulinės genetikos tyrimuose. Ląsteliniai mechanizmai – replikacija, rekombinacija, ląstelių dalijimasis ir metabolizmas – yra panašūs tarp mielių ir aukštesniųjų eukariotų, įskaitant ir žinduolius. Be to, geriausiai žinomos mielių charakteristikos – cukrų fermentacija ir etanolio gamyba (Schneiter, 2004).

S. cerevisiae ląstelės yra apvalios ar kiaušinio formos, 5–10 μm skersmens (Feldmann, 2010). Šių mielių, genomai labai gerai anotuotas (Ishikawa, 2021), o jų branduolio genomą sudaro 16 chromosomų, kuriose yra nustatyta daugiau nei 6000 atvirų skaitymo rėmelių ir daugiau nei 13 mln. bazių. Mielės kaip ir kiti eukariotiniai organizmai turi ir nebranduolinį – mitochondrinį – genomą (Schneiter, 2004). Mielių kultūrų priežiūra yra pigi, palyginti su žinduolių ląstelių kultūromis arba naudojant gyvūnus kaip modelį (Ishikawa, 2021).

Šie mikroskopiniai grybai natūraliai gyvena ant augalų lapų ir gėlių žiedų, dirvožemyje, druskingame vandenyje, taip pat ant odos ir šiltakraujų gyvūnų žarnyne. *Saccharomyces* ląstelės dalijasi pumpuravimo būdu, o lytiškai dauginasi formuodamos iki 8 haploidinių askosporų. (Schneiter, 2004).

1.2.1. Mielės – modelinė sistema tiriant prionus

Su mielėmis nesudėtingai atliekamos genetinės manipuliacijos ir jos yra patikimai naudojamos detaliam analizuojant kitų eukariotų genų produktus. Šių vienaląsčių grybų savybės, apibrėžiančios tinkamumą biologiniams tyrimams: greitas augimas; ląstelių kolonijos agarizuotoje terpėje auga pavieniui; plačiai ištirta genetinė sistema; universali DNR transformacijos sistema, naudojama įvairių genų, koduojančių baltymus, raiškai stebėti. Kitaip nei daugumos kitų organizmų, *S. cerevisiae* ląstelės gali būti perspektyviai tiriamos su dideliu kiekiu žymenų (Schneiter, 2004).

Dėl našių genetinių ir fenotipinių analizių bei ekonomiškai palankių mielių auginimo sąlygų, jų prionai yra naudinga modelinė amiloidų susiformavimo ir dauginimosi *in vivo* bei baltymo-baltymo sąveikų tyrimo sistema (Ishikawa, 2021), kurią galima pritaikyti žmonių ir kitų žinduolių amiloidozėms tirti. Taip pat, mielių prionai yra per citoplazmą paveldimos dalelės, o tai leidžia tirti paveldimumo mechanizmą, kuris veikia baltymų konformacijos lygmenyje, o ne nukleotidų sekos lygyje (Liebman ir Chernoff, 2012).

Kadangi yra daugybė būdų eliminuoti prionus mielėse, manoma, kad kai kurie iš jų gali būti pritaikyti ir žmonėms, nes tam tikrais atvejais amiloidus veikiančios sistemos yra konservatyvios. Įdomu, kad efektyvios, tam tikrų junginių naudojimo strategijos, kuriomis šalinami mielių prionai,

pritaikytos žinduolių prionų pašalinimui, audinių ląstelių kultūrose (Nguyen et al., 2014). Beje, mielės naudojamos kaip bandymų objektas, siekiant išsiaiškinti žmonių amiloidų ir kitų netaisyklingai sulankstytų patogeninių baltymų poveikį ląsteliniams procesams (Wickner et al., 2015). Tokiems tyrimams galima pasitelkti visą genetinių mielių tyrimų metodų spektrą, siekiant identifikuoti prionų sąveikas su ląsteliniiais komponentais, kurias būtų keblu nustatyti žinduolių sistemose (Nguyen et al., 2014).

1.2.2. Mielių prionų savybės

Prionų funkcijos praradimo (angl. *loss-of-function*) fenotipas

1994 metais, remiantis naujais ir ankstesniais duomenimis, Reed Wickner pasiūlė, kad prieš tai žinomi ne mendelinio būdu paveldimi [*URE3*] ir [*PSI*⁺] elementai atitinkamai yra prioninės Ure2 ir Sup35 baltymų formos. Ši hipotezė paaiškino, kodėl [*URE3*] ir [*PSI*⁺] fenotipai atitinka funkcijos praradimo mutacijas *URE2* ir *SUP35* genuose. Darant prielaidą, kad natyvių ląstelių baltymų funkcijos tam tikru būdu yra pakeičiamos, kai formuojasi baltymų agregatai, priono fenotipas atspindi funkcijos praradimą. Pavyzdžiui, kai vyrauja prioninė Sup35 baltymo forma, natyvaus baltymo transliacijos terminacijos aktyvumas sutrikdomas (prarandama funkcija), todėl ties baigties kodonais, mažiau efektyviai nutraukiama ląstelės baltymų transliacija. Panašiai funkcijos praradimo fenotipus sukelia [*URE3*] ir keletas kitų mielių prionų. Būtina pabrėžti, kad prionai gali įgauti naujas funkcijas, pavyzdžiui, Mot3 transkripcijos veiksnio prioninė forma [*MOT3*⁺] reguluoja daugialąsčių formų atsiradimą besipumpuruojančiose mielėse (Chernova et al., 2014).

Iki šiol tikėta hipoteze, kad amiloiduose „įstrigę“ prioniniai baltymai, neturi biologinio aktyvumo arba jis yra labai silpnas. Tačiau, tyrimai su naujai atrastu mielių Vts1 baltymo prionu [*SMAUG*⁺], keičia požiūrį į prionų prigimtį (Itakura et al., 2020, Ishikawa, 2021). [*SMAUG*⁺] reikšmingai slopina baltymų, sukeliančių mejozę arba sporų susidarymą, produkciją. Priklausomai nuo Vts1p agregacijos būsenos, mielių ląstelės dauginasi mitotiškai, kuomet aplinka yra turtinga maistinėmis medžiagomis, o kai jų trūksta, mielės formuoja stresui atsparias sporas. Įdomu, kad [*SMAUG*⁺] prionas yra neamiloidinė, savaimė susirenkanti, į gelį panaši dalelė, kuri hiperaktyvina savo komponentus (Chakravarty et al., 2021). Vts1 baltymas suriša specifines „plaukų segtukų“ struktūras RNR, t.y. transkriptus, koduojančius mejozėje dalyvaujančius baltymus, taip sukeldamas jų degradaciją (Ishikawa, 2021).

Prionai paveldimi ne mendelinio būdu

Genetiškai mielių prionai pasireiškia kaip ne mendeliniai elementai, nes jų pakitusi forma yra pagrįsta ne DNR mutacijomis, kurios paveldimos kartu su chromosomomis. Iš tikrųjų, prionai yra

savaime plintančios baltymų konformacijos, paveldimos ekstrachromosomiškai (Chernova et al., 2014). Kadangi agregatai geba „pagauti“ ne prioninį baltymą ir pastarasis įgauna pakitusią formą, priono požymiai yra dominantiniai ir gali būti paveldimi visų palikuonių (Liebman ir Chernoff, 2012) arba gali pasiskirstyti netolygiai (Chernova et al., 2014). Be to, priono nukleacijos „sėklos“¹, dar vadinamos branduoliais, lokalizuotos citoplazmoje, ir yra efektyviai perduodamos citodukcijos būdu (Conde ir Fink, 1976), kai įvyksta donoro ir recipiento ląstelių citoplazmų susilieėjimas, bet branduoliai nesusijungia (Cox, 1993).

Grįžtamas prionų pašalinimas

Nukleorūgščių replikono panaikinimas, kaip pvz., mitochondrijų genomo panaikinimas veikiant etidžio bromidu, yra negrįžtamas procesas. Tai reiškia, kad mitochondrijų genomas spontaniškai nebeatsiras kamiene, kuriame buvo panaikintas. Priešingai, prionas gali atsirasti *de novo* mažu dažniu, nes baltymas, iš kurio jis susiformuoja, vis dar yra gaminamas ląstelėje (Wickner et al., 2015), o tirpūs baltymai gali įgauti prioninę formą (Chernova et al., 2014). Svarbu paminėti, kad pašalinimo grįžtamumas, bet ne pats pašalinimas, yra prioną apibūdinanti savybė (Wickner et al., 2015).

Nors [*PSI*⁺] ir [*URE3*] prionai labai retai randami natūraliuose ar pramoniniuose mielių izoliatuose, [*PIN*⁺] prionas randamas 6–12 % kamienu (Halfmann, Jarosz, et al., 2012). Be to, trečdalyje natūralių ir pramoninių *Saccharomyces* kamienu pasireiškia prioniniai fenotipai, kuriuos galima eliminuoti laikinai slopinant Hsp104 šaperoną (angl. *heat shock protein* – karščio šoko baltymas, toliau Hsp) (Halfmann, Jarosz, et al., 2012), kuris yra reikalingas nuodugnai iširtų mielių prionų plitimui (Chernova et al., 2014). Tai reiškia, kad dar neidentifikuoti prionai yra plačiai paplitę laukinio tipo mielėse, o tai leidžia svarstyti galimybę, kad mielės aktyviai panaudoja grįžtamą natyvaus baltymo pokytį į prioną, kaip molekulinį jungiklį, kad galėtų reguliuoti tam tikras ląstelės funkcijas. Beje, įmanoma, kad skirtingi to paties priono variantai gali būti tiek patogeniniai, tiek padedantys prisitaikyti arba tas pats variantas gali būti ir žalingas, ir naudingas, priklausomai nuo aplinkos sąlygų (Chernova et al., 2014).

Prionų formavimasis *de novo*

Įrodyta, kad laikinai padidinta įvairių prionizuotis galinčių baltymų raiška, reikšmingai didina galimybę, kad šis baltymas suformuos priono „sėklą“ *de novo* (Derkatch et al., 1996). Iš tikrųjų, perteklinė prioną formuojančio domeno (angl. *prion domain* – prionizacijos domenas, toliau PrD)

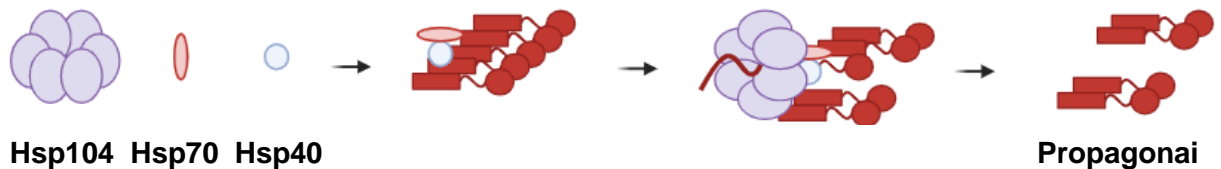
¹ Nukleacijos „sėklos“ / branduoliai – molekulių sancaupos, kurios formuojasi prionams jungiantis tarpusavyje ir keičiant formą. Kai pokytis įvyksta, susiformuoja labai stabilūs agregatas (amiloidas). University of Massachusetts Amherst, 2020).

(ar PrD dalies) raiška gali sukelti šį reiškinių, kuris dažnai yra efektyvesnis nei padidinta viso baltymo raiška. Viena iš to priežasčių – padidėjęs baltymo kiekis gali padidinti tikimybę, kad baltymas bus sulankstytas netaisyklingai, dėl nepakankamo šaperonų kiekio. Esant didesnei baltymo koncentracijai, monomerai greičiau lokalizuoja vieni kitus ir agregatą, prie kurio galėtų prisijungti. PrD taip pat dažniau susilanksto netaisyklingai, kai yra atskirtas nuo likusios baltymo dalies. Be to, padidėjęs baltymo kiekis gali „padėti“ netaisyklingai susilanksčiusiam baltymui išvengti degradacijos proteolitiniais keliais (Liebman ir Chernoff, 2012).

Visgi, perteklinė baltymo sintezė ne visuomet yra pakankama sąlygą susiformuoti prionams. Kai kuriems prionams, dažnis, kuriuo jie indukuojami dėl padidintos baltymo sintezės, reikšmingai pasikeičia priklausomai nuo kitų (heterologinių) prionų ar į juos panašių agregatų būvimo. Geriausiai ištirtas pavyzdys yra $[PSI^+]$ priono indukcija, kuri yra sustiprinama aplinkoje esant Rnq1 prioninei formai $[PIN^+]$, dar žinoma kaip $[RNQ^+]$, kitiems glutaminu ir asparaginu (toliau QN) turtingiems prionams ar QN turtingiems baltymams agreguotoje formoje (Derkatch ir Liebman, 2007). Kai $[PSI^+]$ indukuojamas esant perteklinei Sup35 sintezei žemesniu dažniu [*psi*, *pin*] aplinkoje, kiekvienoje $[PSI^+]$ ląstelėje *de novo* susiformuoja $[PIN^+]$ (Derkatch et al., 2000). Svarbu, kad $[PIN^+]$ prionas nėra būtinas, kad susiformuotų $[PSI^+]$, nes jis *de novo* susiformuoja ir [*pin*] kamienuose (Chernova et al., 2011).

Hsp baltymų įtaka prionų agregacijai normaliomis ir streso sąlygomis bei *de novo* prionų formavimuisi

Ląsteliniai apsaugos mechanizmai (Chernova et al., 2014), kaip Hsp, yra produkuojami, kai ląstelės laikinai atsiduria temperatūroje, aukštesnėje nei jų normali augimo temperatūra (Ponomarenko et al., 2013). Jų paskirtis yra saugoti ląsteles nuo streso paveiktų baltymų agregacijos, atpažinti amiloidinius agregatus ir su stresu susijusius baltymus. Hsp tarnauja kaip pagrindinis prionų formavimosi ir plitimo reguliatorius mielėse (Chernova et al., 2014). Sutrikdytos šaperonų funkcijos dažnai sukelia prionų atsiradimo ir / ar praradimo dažnio padidėjimą (Liebman ir Chernoff, 2012). Kaip rodo $[PSI^+]$, mielių prionų plitimui *in vivo*, išskyrus $[ISP^+]$ (Rogoza et al., 2010) ir $[GAR^+]$ (Brown ir Lindquist, 2009), reikia šaperono Hsp104, kuris gali skatinti amiloido skilimą ir generuoti naujus propagonų galus, naujai susintetintų baltymų molekulių prisijungimui prie amiloido (Chernoff et al., 1995; Liebman ir Chernoff, 2012). Šaperonų veikimo schema pateikta **1.1 pav.**



1.1 pav. Šaperonų funkcija Sup35 baltymo priono propagacijoje

Polimerų fragmentacija ir propagonų susidarymas esant normaliam Hsp104, Hsp70 ir Hsp40 baltymų kiekiui. Šaltinis: sudaryta darbo autorės, remiantis Chernova et al., 2017, naudojantis Biorender internetine programa.

Hsp104 ATPazės aktyvumo slopinimas ląstelių augimo metu, terpėje esant guanidino hidrokloridui (toliau GuHCl), veda prie laipsniško prionų praradimo ląstelėms dalijantis (Ferreira et al., 2001). Įdomu tai, kad GuHCl poveikis prionų praradimo kinetikoje ir agregato augime, skiriasi nuo Hsp104 poveikio, kai pastarasis yra išekvotas arba jo veikimas yra nuslopintas jį mutavus, bent jau [*PSI*⁺] atveju (Wegrzyn et al., 2001; Y. N. Park et al., 2012). Tai leidžia manyti, kad kai aplinkoje yra GuHCl, labiau išlaikomas yra Hsp104 „apkarpymo“ aktyvumas negu „fragmentacijos“ (Y. N. Park et al., 2012). Svarbu, kad padidinta Hsp104 raiška slopina [*PSI*⁺] (Chernoff et al., 1995) ir [*MOD*⁺] (Suzuki et al., 2012), bet ne kitus mielių prionus (Chernova et al., 2014).

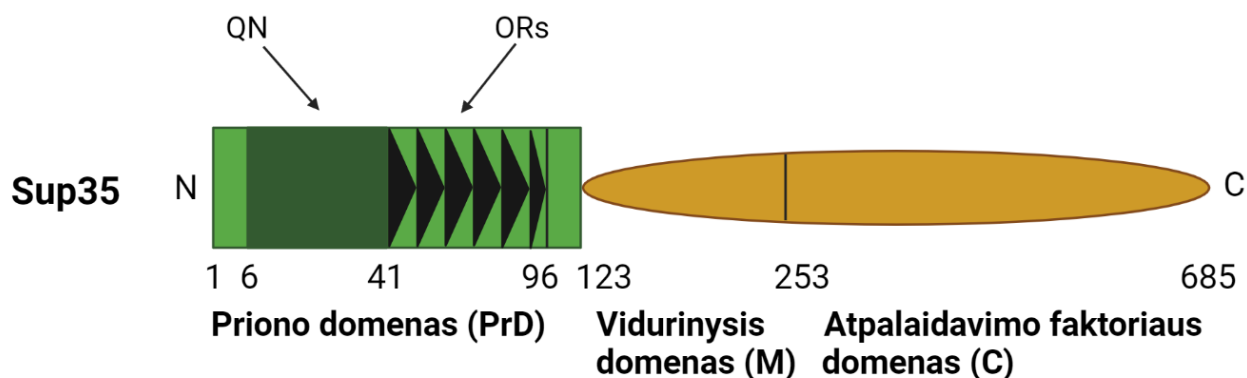
Manoma, jog Hsp104 ir jo ortologas bakterijose ClpB (angl. *caseinolytic peptidase B* – kazenolitinė peptidazė B) yra susiję su streso paveiktų baltymų disagregacija (Glover ir Lum, 2009). Hsp104 veikia kartu su kitais šaperonais, specifiskai su Hsp70 ir Hsp40 baltymais tiek prionų plitime, tiek karščio paveiktų baltymų disagregacijoje (Chernova et al., 2014). Hsp70 ir Hsp40 baltymų šeimos yra konservatyvios ir kituose organizmuose, taip pat ir žmonėse (Rikhvanov et al., 2007) bei dažnai sąveikauja su žinduolių amiloidais (Chernova et al., 2014). Išsiaiškinta, kad bakteriniai šių baltymų homologai gali pakeisti mielių šaperonus mielių prionų plitime (Reidy et al., 2012). Nors Hsp104 ortologai yra konservatyvūs bakterijose, augaluose ir protistuose, jie nėra identifikuoti daugialąsčiuose gyvūnuose. Visgi, gyvūnų ląstelėse vyksta indukuotas termotoleravimo reiškinys, lyginamas su Hsp104 veikimu mielėse. Tai leidžia manyti, kad funkcinis Hsp104 analogas egzistuoja ir gyvūninėse ląstelėse (Chernova et al., 2014). Kiti atlikti tyrimai rodo, kad netipiškas su Hsp70 susijęs šaperonas Hsp110 gali veikti kartu su Hsp70 ir Hsp40, kad įvykdytų baltymų disagregaciją (Shorter, 2011).

1.3. Sup35 baltymas ir jo prioninė forma [*PSI*⁺]

Sup35 baltymas yra sudarytas iš trijų domenų. Šis baltymas yra translaciijos terminacijos veiksnys bei gali įgauti prioninę formą ir sudaryti baltymų amiloidus (Chernova et al., 2017).

1.3.1. Sup35 baltymo struktūra

Sup35 baltymą sudaro: N-terminalinis priono / prioninis domenas (PrD arba Sup35N); vidurinis jungiantysis (angl. *linker*) domenas (Sup35M) ir C-proksimalinis / atpalaidavimo faktoriaus domenas (Sup35C), funkcionuojantis transliacijos terminacijoje (Chernova et al., 2017). Vizualus domenų išsidėstymas pateiktas **1.2 pav.**



1.2 pav. Sup35 baltymo struktūra

PrD – žalios spalvos stačiakampis, neprioniniai regionai – geltonos spalvos elipsė. QN – glutaminu ir asparaginu turtingas regionas; OR – oligopeptidiniai pasikartojimai. Skaičiai rodo aminorūgščių pozicijas. Ribos tarp Sup35N ir Sup35M pažymėtos pasirinktinai, nes skirtingose publikacijose yra žymimos tarp 100 ir 137 aminorūgščių. Šaltinis: sudaryta darbo autorės, remiantis Liebman & Chernoff, 2012, naudojantis Biorender internetine programa.

PrD yra reikalingi prionų formavimuisi ir plitimui ir gali palaikyti prionų formą net be likusios baltymo dalies (Ross, Minton, et al., 2005; Inge-Vechtomov et al., 2007). Natyvioms baltymo funkcijoms atlikti PrD dažniausiai nėra būtinas (Liebman ir Chernoff, 2012), bet kartais gali atlikti ir kitas funkcijas, ne tik susijusias su prionizacija. Sup35N sąveikauja su poli(A) surišančiu baltymu (angl. *poly(A)-binding protein*, toliau PABP) veikiančiu mRNR stabilumą (Hosoda et al., 2003). *S. cerevisiae* Sup35 PrD yra QN-turtingas ruožas, kurį apima pirmos 40 aminorūgščių bei netobulų (angl. *imperfect*) 5,5 oligopeptinių pasikartojimų (angl. *oligopeptide repeats*, toliau OR) regionas. Šie OR yra panašūs į žinduolių PrP pasikartojimus tarp 47 ir 97 aminorūgščių (Liebman ir Chernoff, 2012). PrD fragmentas, reikalingas agregacijai, yra trumpesnis nei tas, kurio reikia efektyviam priono plitimui (Borchsenius et al., 2001), ir yra apribotas QN-turtingu ruožu (Osherovich et al., 2004). Pasiūlyta, kad Sup35 PrD gali būti padalintas į „agregacijos“ (QN-ruožas) ir į „plitimo“ (OR) elementus (Chernoff, 2004; Osherovich et al., 2004), ir kad OR elementas yra įtrauktas į sąveiką su Hsp104 (Liebman ir Chernoff, 2012).

OR pailgėjimas padidina *de novo* [PSI⁺] generaciją (Liu ir Lindquist, 1999), nors „sumaišyti“ (angl. „*scrambled*“) Sup35 PrD, kuriuose trūksta OR, leidžia manyti, kad OR nėra būtini sąveikai su šaperonais, atsakingais už prionų plitimą (Ross, Edskes, et al., 2005). „Sumaišyti“ Sup35 PrD,

kuriuose išlieka aminorūgščių sudėtis, bet ne visa nuosekli seka, paprastai gali generuoti amiloidus *in vitro* (Liu et al., 2007), ir prionus *in vivo* bei juos propaguoti. Tai rodo, kad aminorūgščių išsidėstymas yra svarbus priono savybėms palaikyti (Ross et al., 2004; Ross, Edskes, et al., 2005). OR yra dažnai asocijuojami su prionais, nes įvykus tam tikroms duplikacijoms, regionai, su palankia prionų formavimuisi aminorūgščių sudėtimi, pailgėja (Liebman ir Chernoff, 2012).

Sup35M domene yra gausu krūvį turinčių aminorūgščių ir manoma, jog šis domenas padeda palaikyti pusiausvyrą tarp agreguotos ir neagreguotos baltymo formos, galimai per sąveiką su Hsp baltymais (Liu et al., 2002). Iš tikrųjų, Sup35M sąveikauja su Hsp104 *in vitro* ir veikia [*PSI*⁺] eliminacijos procese *in vivo* (Helsen ir Glover, 2012).

Įdomu, kad mielių PrD domenų evoliucija paprastai vyksta greičiau nei to paties baltymo regionų, atsakingų už pagrindines ląstelės funkcijas (Liebman ir Chernoff, 2012). Sup35C regionai filogenetiškai artimiausiose mielėse *Saccharomyces paradoxus* ir *S. cerevisiae* yra 100 % konservatyvūs, o Sup35N ir Sup35M regionai, atitinkamai, yra 94 % ir 87 % konservatyvūs (Chen et al., 2007). Sup35 ortologai tarp *Saccharomyces* ir *Pichia* ar *Candida*, Sup35N ir Sup35M regionuose varijuoja tik 30–40 % aminorūgščių identiškas (Inge-Vechtomov et al., 2007). Esant tokiai įvairovei, aiškiai galima pastebėti tik kai kurių Sup35NM regionų aminorūgščių sudėties ir organizacijos dėsninumų išlikimą (pavyzdžiui, QN turtingo ruožo ir OR buvimą, Sup35N ir Sup35M praturtinimą krūvį turinčiomis aminorūgščių liekanomis). Nepaisant skirtumų, dauguma Sup35 baltymų, išgautų net iš labai filogenetiškai nutolusių mielių rūšių, kurios buvo tiriamos, gali formuoti prionus *S. cerevisiae*, išimtis yra tik *Schizosaccharomyces pombe* (Liebman ir Chernoff, 2012).

Aleksander Dergalev su kolegomis, 2019 metais, atliko eksperimentą, kurio tikslas buvo degradacijos proteinazės K (angl. *proteinase K*, toliau PK) metodu nustatyti Sup35 priono šerdies struktūrą, galimus jos pokyčius ir jų ryšį su fenotipu. Išsiaiškinta, kad Sup35 priono šerdį sudaro keturi PK atsparūs peptidai, lokalizuoti skaičiais įvardytuose regionuose: 1 regionas (2–72 aminorūgštys), 2 regionas (73–124 aminorūgštys), 3 regionas (125–153 aminorūgštys) ir 4 regionas (154–221 aminorūgštys). PK atsparios struktūros šiuose regionuose įvardintos kaip 1-4 šerdys, atitinkamai pagal regiono skaičių. Įdomu, kad riba tarp 2 ir 3 regionų sutapo su riba tarp Sup35N ir Sup35M domenų. Taip pat išsiaiškinta, kad šerdis, esanti 1-ame regione, yra didžiausia nustatyta struktūra bei yra geriausiai apsaugota nuo PK (Dergalev et al., 2019).

Ryškesniausiai pastebimas struktūrinis požymis Dergalev ir kolegų tyrime buvo pilnai apsaugotas Sup35N regionas, esantis nuo 2 iki 32 aminorūgšties (Dergalev et al., 2019). Prolino pakaitos ir glicino insercijos mutagenėzė parodė, kad šis regionas yra būtinas [*PSI*⁺] plitimui (Huang et al., 2015), ir yra pagrindinis Sup35 priono struktūros elementas visuose tirtuose [*PSI*⁺] variantuose (Dergalev et al., 2019).

Tyrėjai taip pat išsiaiškino, kad 2–32 aminorūgščių ir 33–72 aminorūgščių regionų struktūros reikšmingai skiriasi. 33–72 aminorūgščių regionas buvo tik dalinai apsaugotas nuo PK, o atskyrus jį nuo 2–32 aminorūgščių regiono, jis visai prarado apsaugą, kas rodo, jog šiame regione atsparumą PK lemia tik jo lokalizacija (Dergalev et al., 2019).

1.3.2. Sup35 ir baltymų transliacija

Sup35 baltymas besijungiantis į kompleksą su Sup45 baltymu yra būtinas efektyviai transliacijos terminacijai mielėse. Nustatyta, kad abu supresoriai yra eRF (angl. *eukaryotic release factor* – eukariotinis paleidimo veiksnys) homologai, atitinkamai eRF3 ir eRF1 (Inge-Vechtomov et al., 2003). Sup45 baltymas atpažįsta baigties kodonus ir kaip ir eRF1, turi struktūrą, primenančią tRNR bei inicijuoja peptidil-tRNR hidrolizę (Stansfield et al., 1997).

Sup35 baltymas yra modulinis baltymas, C-gale turintis regioną, būtiną ir pakankamą transliacijos terminacijai, reikalingą ląstelių gyvybingumui palaikyti (Salas-Marco ir Bedwell, 2004) bei pasižymintį dideliu konservatyvumu (Chernoff et al., 1992). Šį regioną sudaro GTPazės klostė (angl. *GTPase fold*), randama G-baltymuose (Salas-Marco ir Bedwell, 2004) ir sąveikaujanti su Sup45 baltymu (Stansfield et al., 1995). Susidaręs kompleksas skatina transliacijos terminaciją ir transliacijos komplekso atpalaidavimą. Terminacijos funkcijai įvykdyti, Sup35 ir Sup45 baltymai sąveikauja su transliuojančia ribosoma ir atpažįsta baigties kodoną (Wada ir Ito, 2014). Sup35 baltymo vykdoma guanozino trifosfato hidrolizė teikia energiją transliacijos komplekso disociacijai ir naujo susintetinto polipeptido atpalaidavimui (Dever et al., 2016).

Sup35 ir kitų eRF3 baltymų regionai už C-galo nėra būtini transliacijos terminacijai (Chernoff et al., 1992; Ter-Avanesyan et al., 1993). Tačiau, žinduoliuose, eRF3 neesminis N-galo regionas, sąveikauja su PABP, reikalingu ne tik transliacijos iniciacijai, bet ir mRNR stabilizavimui (Hoshino et al., 1999). *In vitro* transliacijos eksperimentai parodė, kad PABP tiesiogiai paveikia transliacijos terminacijos aktyvumą sustiprindamas eRF3 sąveiką su ribosoma (Ivanov et al., 2016). Autoriai iškėlė hipotezę, kad sąveika tarp PABP ir eRF3 yra labai svarbi, nukreipiant eRF3/eRF1 kompleksą šalia baigties kodonų, efektyviai transliacijos terminacijai (Ivanov et al., 2016). Nepaisant neesminių sekų skirtumo tarp mielių Sup35 baltymų ir žinduolių eRF3, Sup35 N-galo sritis jungiasi su PABP baltymo mielių homologu Pab1 (Roque et al., 2015). Keli mielių tyrimai parodė, kad prolinu turtingas regionas Pab1 baltyme (P domenas) yra labai svarbus asociacijai su Sup35 baltymo N-galu per nekanoninę Pab1 jungimosi vietą (Roque et al., 2015). Dėl to, Lyke ir kolegos kelia hipotezę, kad žinduoliuose PABP veikimas transliacijos terminacijoje yra panašus ir mielėse. Tai reiškia, kad sąveika tarp Pab1 ir Sup35 baltymų nukreipia Sup35/Sup45 kompleksą link baigties kodono, o tai gali suteikti transliacijos mechanizmui prieigą prie atpalaidavimo veiksnių, kad transliacija būtų sustabdyta laiku ir efektyviai (Lyke et al., 2019).

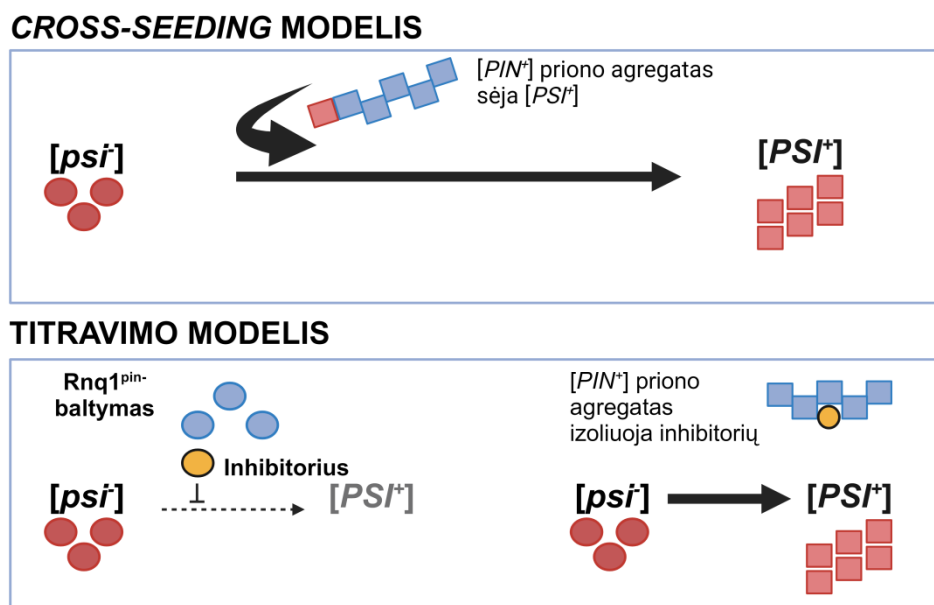
1.3.3. Sup35 baltymo prioninė forma [*PSI*⁺]

[*PSI*⁺] prionas yra netaisyklingai sulankstyta, savaime plintanti, infektyvi Sup35 baltymo forma (Liebman ir Chernoff, 2012). Ląstelių gyvybingumas reikšmingai nesumažėja esant [*PSI*⁺] fenotipui, o tai leidžia manyti, kad egzistuoja efektyviai funkciją atliekančio Sup35 baltymo kiekis, kuris užtikrina bazinį transliacijos terminacijos lygį (Zhou et al., 1999). Visgi, toksiškumas yra pastebimas, kai padidinama Sup35 baltymo raiška, aplinkoje esant [*PSI*⁺] (Derkatch et al., 1996). Šis toksiškumas sukliamas, kai dėl perteklinės *SUP35* geno raiškos agreguojasi Sup35 baltymai. Taip pat Sup35 baltymo perteklius patekęs į agregatus nebevykdo natyvių funkcijų (Vishveshwara ir Liebman, 2009), tai leidžia manyti, jog vyrauja subtili pusiausvyra, tarp priono išlaikymo ir užtikrinimo, kad Sup35 ir Sup45 baltymai galės efektyviai dalyvauti transliacijos terminacijoje (Lyke et al., 2019).

Remiantis „somatinių mutacijų“ hipoteze apie sporadinių amiloidinių ligų genezę (Nicolas ir Veltman, 2019), amiloidai gali atsirasti atskirose ląstelėse, turinčiose tam tikras postzigotines mutacijas, o paskui plisti į naujas ląsteles ir audinius prionų plitimo mechanizmu (Goedert et al., 2017). Dergalev ir kolegų 2021 metų tyrimas su [*PSI*⁺] rodo, kad viena iš tokių mutacijų yra *nonsense* mutacija, galinti smarkiai padidinti prionų amiloido atsiradimo dažnį (Dergalev et al., 2021). Manoma, kad [*PSI*⁺] galimybė propaguotis per daugelį mielių kartų yra ląstelėms naudinga savybė, o jos priežastis galėtų būti fenotipinė variacija, kurią ir palengvina būtent *nonsense* mutacijos atviro skaitymo rėmelyje arba subtili transliacijos terminacijos efektyvumo variacija (True ir Lindquist, 2000). Buvo rasta 100 genų, kurių baigties kodono „perskaitymo“ atvejai parodė, kad daugelis genų, reaguojančių į stresą, buvo slopinami esant [*PSI*⁺]. Nustatyta, kad [*PSI*⁺] taip pat turi įtakos skaitymo rėmelių atrankai, nepriklausomai nuo jo poveikio transliacijos terminacijos efektyvumui. Vis dėlto, naudojant stabilaus izotopų žymėjimo aminorūgštimis ląstelių kultūroje (angl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC*) ir naujos kartos sekoskaitos metodus, išsiaiškinta, kad [*PSI*⁺] nesukelia globalių proteominių pokyčių (Chan et al., 2017).

Nežymiai padidinti prionų formavimosi dažnį gali perteklinė Sup35NM domenų raiška, o reikšmingai padidinti jį gali kito baltymo priono būvimas aplinkoje. Pavyzdžiui, kai aplinkoje yra [*PIN*⁺], Sup35 pokytis į prioninę formą padažnėja (Sondheimer ir Lindquist, 2000; Derkatch et al., 2001; Osherovich ir Weissman, 2001). Pasiūlyti du [*PSI*⁺] formavimosi indukcijos dalyvaujant [*PIN*⁺] proceso modeliai. Pirmasis yra inhibitorinis titravimo modelis, kuris rodo, kad [*PIN*⁺] prionas izoluoja arba slopina veiksnius, pvz., šaperonus, kurie paprastai slopina Sup35 agregaciją (Derkatch et al., 2001; Osherovich ir Weissman, 2001). Visgi, yra per mažai tiek šį modelį patvirtinančių, tiek paneigiančių įrodymų. Antrasis, angliškai vadinamas *cross-seeding* modeliu, rodo, kad egzistuojantys baltymų agregatai yra naudojami kaip šablonas, sukelti netaisyklingą antro

heterologinio baltymo susilankstymą ir agregacija (**1.3 pav.**) (Derkatch et al., 2001; Osherovich ir Weissman, 2001).

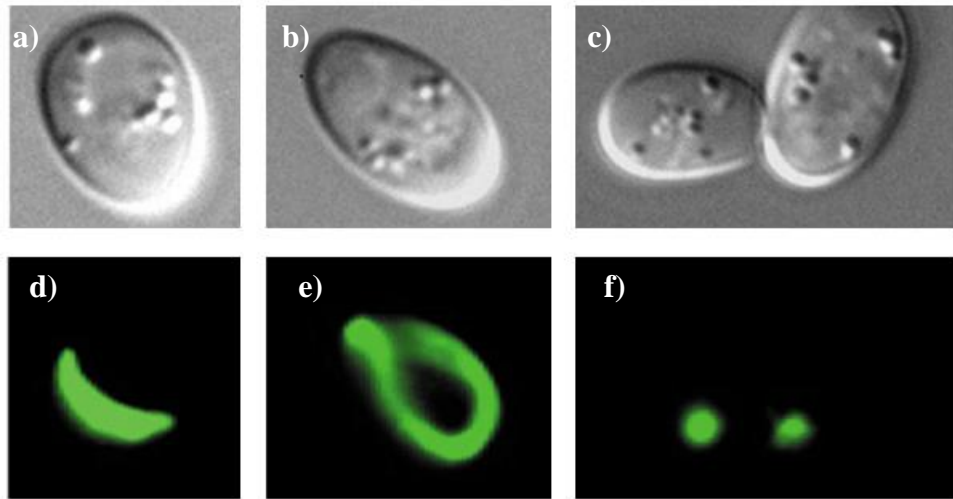


1.3 pav. $[PSI^+]$ formavimosi, indukcijos per $[PIN^+]$, *cross-seeding* ir titravimo modeliai

Cross-seeding modelis demonstruoja, kaip esant $[PIN^+]$, formuojasi $[PSI^+]$ prionai. Titravimo modelis rodo, kaip aplinkoje nesant $[PIN^+]$ prionui, $[PSI^+]$ formavimąsi stabdo inhibitorius, o aplinkoje esant $[PIN^+]$, jis izoluoja inhibitorių ir formuojasi $[PSI^+]$. Šaltinis: sudaryta darbo autorės, remiantis Liebman & Chernoff, 2012, naudojantis Biorender internetine programa.

In vitro tyrimais parodyta, kad Rnq1 agregatai gali skatinti Sup35 agregatų formavimąsi (Keefe et al., 2017), o *in vivo* tyrimai suteikė kolokalizacinių ir genetinių įrodymų antrajam modeliui (Derkatch et al., 2004; Keefe et al., 2017). Rnq1 sekoje, ilgas QN turtingas regionas netoli C-galo yra būtinas $[PIN^+]$ plitimui, o Q298R (glutamino į arginą) pakaita šiame regione gali žymiai sumažinti $[PSI^+]$ indukciją (Derkatch et al., 2001; Keefe et al., 2017).

Parodyta, kad *de novo* $[PSI^+]$ formavimasis yra veikiamas aktino citoskeleto ir baltymų kokybės kontrolės sistemų (Lyke et al., 2019). Genų, kurie veikia endocitinės žievės aktino kūnelius (angl. *endocytic cortical actin patches*), praradimas, lemia sumažėjusį linijos, žiedo ir taško agregatų struktūrų formavimosi dažnį (skirtingos struktūros pateiktos **1.4 pav.**) (Ganusova et al., 2006).



1.4 pav. Skirtingos prioninio baltymo Sup35NM-GFP agregatų struktūros *S. cerevisiae* GF822 [*psi*⁻] [*PIN*⁺] kamiene a) linijos, b) žiedo, c) taško struktūros vizualizuotos skaitmeninių vaizdų koreliacijos (angl. *digital image correlation, DIC*) metodu; d) linijos, e) žiedo, f) taško struktūros vizualizuotos fluorescencinės mikroskopijos metodu (Taneja et al., 2007).

Iškelta hipotezė, kad glutaminu praturtinti endocitinio aktino kūnelio baltymai netoli ląstelės periferijos, leidžia *cross-seeding* būdu telktis taško, žiedo ir linijos formų Sup35 agregatams (Ganusova et al., 2006). Taip pat prionų formavimąsi veikia baltymų kokybės kontrolė (Lyke et al., 2019). Mutacijos, kurios sutrikdo autofagiją, atsaką į oksidacinį stresą arba ubikvitino proteosomos sistemą, lemia padidėjusį prionų formavimosi dažnį (Allen et al., 2007; Chernova et al., 2011). Tai leidžia manyti, kad tam tikromis sąlygomis baltymų kokybės kontrolės mechanizmas aktyviai riboja šį dažnį, o ilgalaikis stresas gali jį padidinti. Poveikis druska ar vandenilio peroksidu 12–24 valandas, lemia aukštą ląstelių mirties lygį. Visgi, išlikusiose populiacijose prionų formavimosi dažnis padidėja vidutiniškai 60 kartų (Tyedmers et al., 2008). Prionų susiformavimo dažnio padidėjimas, kaip atsakas į ilgalaikį stresą, gali būti priemonė generuoti fenotipinius *nonsense* mutacijų pokyčius skaitymo rėmelyje arba translacijos terminacijos efektyvumo pokyčius. Todėl ši variacija gali leisti atsirinkti nedidelę populiacijos grupę, kuri puikiai tiktų ekstremaliai aplinkai (Lyke et al., 2019).

1.3.4. [*PSI*⁺] amiloido formavimasis

Dergalev ir kolegų 2019 metais atliktas tyrimas, kurio metu Sup35 stiprių ir silpnų [*PSI*⁺] lizatų mėginiai „išsėti“ *in vitro* ir stebėti elektroninės mikroskopijos metodu. Paaikškėjo, kad kiekviename preparate vienu metu buvo dviejų tipų Sup35NM fibrilių – „sutankėjusių“ (angl. *thick*) ir „atsipalaidavusių“ (angl. *thin*). (Dergalev et al., 2019). „Sutankėjusiose“ fibrilėse visi Sup35NM

Dergalev ir kolegų tyrimo duomenys prieštarauja šiam modeliui. Pirma, „serpantino“ struktūroje visos amiloido šerdies dalys turi vienodas savybes, tačiau Dergalev ir kolegos nustatė asimetriją ir esminius skirtumus tarp 2–32 aminorūgščių ir 33–72 aminorūgščių regionų. Antra, Sup35 N-galo aminorūgštys yra visiškai apsaugotos nuo PK, o tokia apsauga sunkiai pasiekama „serpantino“ struktūros krašte, todėl galima spėti, kad šios aminorūgštys yra paslėptos amiloido struktūros viduje. Trečia, Dergalev ir kolegos nepastebėjo periodiško PK prieinamumo, atitinkančio „serpantino“ posūkius. Ketvirta, 1-oji šerdis baigiasi ties trečiu iš penkių OR, kai tuo tarpu „serpantino“ modelyje neaišku, kodėl likę du pasikartojimai neatitinka tokio paties potencialo formuoti amiloidinę struktūrą (Dergalev et al., 2019).

1.4. Ubikvitilimas

Netaisyklingas baltymų sulankstymas yra procesas, vykstantis visose ląstelėse. Netaisyklingai sulankstyti baltymai gali sukelti proteotoksiškumą, nes prarandama natyvaus baltymo funkcija, arba jie pasižymi toksiškomis funkcijomis. Kad išspręstų šiuos iššūkius, eukariotinės ląstelės turi proteostazės mechanizmą, kuris nuolat veikia tam, kad palaikytų pakankamą natyviai sulankstytų baltymų kiekį (Cascarina et al., 2018). Proteostazės mechanizmas susideda iš trijų pagrindinių sistemų: 1) baltymų šaperonų tinklo, kuris padeda besiformuojantiems baltymams susilankstyti ir taip pat pakartotinai sulanksto dalinai arba visiškai denatūruotus baltymus; 2) ubikvitino-proteosomos sistemos ir 3) autofagijos sistemos. Visos trys sistemos kartu veikia pasenusių, netaisyklingai sulankstytų ar agreguotų baltymų degradavimą (Labbadia ir Morimoto, 2015). Nepaisant nuolatinės baltymų kokybės kontrolės sistemų reguliacijos, daugybė ligų atsiranda būtent dėl netaisyklingai sulankstytų baltymų ir agregacijos. Be to, įvairūs baltymai sudaro funkcinis agregatus, kurie dalyvauja reguliuojant įvairius ląstelių procesus (Silva ir Cordeiro, 2016). Todėl, suvokimas, kaip proteostazės aparatas nustato netaisyklingai sulankstytus baltymus, ir kaip kai kurie į agregaciją linkę baltymai išvengia šio aptikimo, gali leisti suprasti funkcinį ir patogeninį agregacijos mechanizmus (Cascarina et al., 2018).

1.4.1. Ubikvitinas, ubikvitilimo tipai ir deubikvitilimas

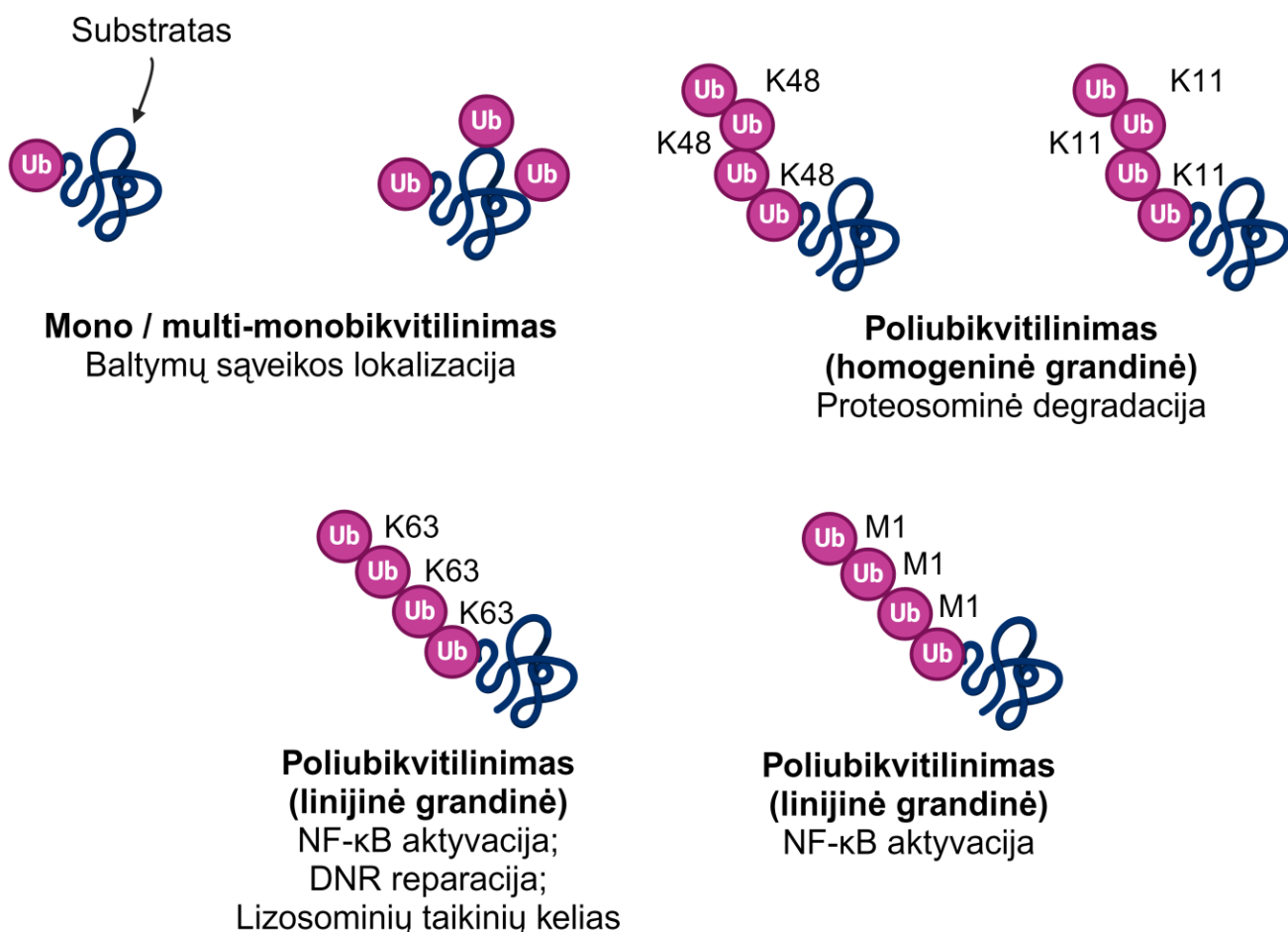
Ubikvitinas yra 8,5 kDa polipeptidas, sudarytas iš 76 aminorūgščių. Tai yra labai konservatyvus baltymas daugelyje eukariotų ir gali būti kovalentiškai prijungtas prie taikinio lizino kaip monomeras arba kaip su lizinu susietas polimeras. Ubikvitino prisijungimas prie viduląstelinio baltymų gali pakeisti taikinio savybes daugeliu būdų, nuo lokalizacijos, aktyvumo ir sąveikų, iki selektyvios degradacijos (Panassenko, 2014).

Mielėse ubikvitiną koduoja keturi genai *UBI1–4* (Finley et al., 1987). *UBI1*, *UBI2* ir *UBI3*

koduoja hibridinius baltymus, kuriais ubikvitinas atitinkamai jungiasi su didžiaisiais ribosomų baltymais Rpl40A ir Rpl40B (angl. *ubiquitin-60S ribosomal protein L40A/B* – ubikvitino-60S ribosominis baltymas L40A/B) arba su mažuoju ribosominiu baltymu Rps31 (angl. *ubiquitin-40S ribosomal protein S31* – ubikvitino-40S ribosominis baltymas S31). *UBI4* koduoja poliubikvitino prekursorių, kurių sudaro penki ubikvitino pasikartojimai, nuo pradžios iki galo (angl. *head-to-tail*). Pastebėta, kad šio geno raiška yra ypač intensyvi streso sąlygomis, pvz., esant aukštai temperatūrai ar maistinių medžiagų trūkumui (Panassenko, 2014).

Ubikvitilinimas yra reguliuojamas procesas, kuriame E1–3 (angl. *enzyme 1 / 2 / 3* – fermentas 1 / 2 / 3) fermentai nuosekliai vykdo tam tikrus veiksmus. E1 – ubikvitiną aktyvuojantis fermentas – aktyvaciją vykdo formuodamas tiolio esterinius ryšius tarp ubikvitino C-gale esančio glicino ir E1 cisteino, nuo ATP priklausomo proceso metu. Aktyvuotas ubikvitinas prijungiamas prie E2 – ubikvitiną prijungiančio fermento – taip pat per tiolio esterinį ryšį. E2 sąveikauja su E3, ubikvitino ligaze, kuri atpažįsta substratą. Galiausiai ubikvitinas prijungiamas prie taikinio, susiformuoja kovalentinis izopeptidinis ryšys tarp ubikvitino C-galo glicino ir taikinio aminorūgšties (dažniausiai N-galo lizino) (Panassenko, 2014). Retais atvejais ubikvitinas gali būti prijungtas prie baltymo-taikinio N-galo cisteino, serino ar treonino aminorūgščių (McDowell ir Philpott, 2013). Mielėse yra vienas E1, trylika E2 ir apie šimtas E3 baltymų (Finley et al., 2012).

Ubikvitilinimas gali įvykti: vieną kartą (monoubikvitilinimas); kelis kartus, bet ant skirtingų substrato lizinių (multi-monoubikvitilinimas); kelis kartus ant to paties substrato lizino (poliubikvitilinimas). Monoubikvitilinimas ir multi-monoubikvitilinimas veikia baltymų aktyvumą, lokalizaciją ir sąveikas. Ubikvitino molekulėje yra septyni lizinai (Lys-6, -11, -27, -29, -33, -48, -63) ir metioninas (Met-1) N-gale, kurie gali dalyvauti ubikvitilime (Panassenko, 2014). Gali formotis ir poliubikvitino grandinės, kurios molekuline prasme yra identiškos, bet struktūriškai skiriasi ir lemia skirtingas funkcijas per sąveikas su skirtingais ubikvitino receptoriais (**1.6 pav.**) (Walsh ir Sadanandom, 2014).



1.6 pav. Ubikvitolinimo tipai ir jų funkcijos

Ubikvitino 1-oji metionino ir septynios lizino aminorūgščių liekanos (Lys-6, -11, -27, -29, -33, -48, -63) gali sudaryti specifines grandinių jungtis su skirtingomis konformacijomis ir atlikti specifines funkcijas. Šaltinis: sudaryta darbo autorės, remiantis Park & Ryu 2014, naudojantis Biorender internetine programa.

Ubikvitolinimas yra grįžtama modifikacija (Panassenko, 2014). Ubikvitinas nuo taikinio baltymo gali būti pašalintas dėl deubikvitolinančių fermentų (angl. *deubiquitinating enzymes*, toliau DUB) aktyvumo (Amerik ir Hochstrasser, 2004). Deubikvitolinimą gali vykdyti dvi pagrindinės DUB klasės, cisteino proteazės ir metaloproteazės. Cisteino DUB proteazės aktyviajame centre turi cisteiną, o metaloproteazės – cinką (Panassenko, 2014).

1.4.2. Proteosoma

Proteosomą sudaro 33 skirtingi subvienetai ir tai yra kompleksiausia žinoma proteazė (Finley, 2009). Pagrindinė proteosomos funkcija yra degraduoti su ubikvitinu sujungtus baltymus. Proteosomos yra sudarytos iš dviejų dalių: 19S reguliacinės dalies (angl. *regulatory particle*, toliau RP) ir 20S šerdies dalies (angl. *core particle*, toliau CP). RP atpažįsta substratus, kuriuos reikia degraduoti, o CP pasižymi proteolitinio aktyvumo vietomis, kurios yra atskirtos vidinėje CP erdvėje. Tai užtikrina griežtai ribojamą prieigą prie šių vietų ir sumažina nespecifinę proteolizę.

Substratai iš RP nukreipiami į CP per siaurą substratų translokacijos kanalą, kuris gali būti atviras arba uždaras. Globuliniai baltymai turi būti išlankstyti, kad galėtų kirsti šį kanalą (Finley et al., 2012).

1.4.3. Prionai, jų ubikvitilimas ir degradacija proteosomoje

Kai kurių genų, koduojančių šaperonus ir ubikvitino proteosomos sistemos komponentus, veikiančius netaisyklingai sulankstytų baltymų pertvarkymą, delecijos ar pakaitos, sukelia *de novo* prionų formavimąsi, ypač Sup35 priono atveju (Liebman ir Chernoff, 2012; Chernova et al., 2014). *UBC4* (angl. *ubiquitin conjugating enzyme E2 4*) geno, kuris koduoja vieną iš pagrindinių ubikvitiną jungiančių fermentų E2, delecija (Δ) padidina [PSI^+] atsparumą perteklinio Hsp104 veikimui ir *de novo* [PSI^+] formavimąsi (Allen et al., 2007). Svarbu pabrėžti, kad padažnėjęs [PSI^+] formavimasis dėl *Ubc4* yra nepriklausomas nuo bet kokio kito priono buvimo, nors ir reikalauja Rnq1 baltymo būvimo aplinkoje, bet taip pat neprioninėje būsenoje. Paprasčiausias *Ubc4* poveikio paaiškinimas būtų, kad ubikvitinimo defektas stabdo netaisyklingai sulankstyto Sup35 baltymo degradavimą ir taip padidėja jo kiekis bei prioninės formos įgavimo dažnis (Liebman ir Chernoff, 2012). Visgi, nepaisant atliktų tyrimų rezultatų (Chernova et al., 2003), nėra įrodyta, kad Sup35 lygis yra reguliuojamas ubikvitilimo (Allen et al., 2007; Chernova et al., 2017; Greene et al., 2020). Kita vertus, *ubc4Δ* padidina vieną DNR grandinę prilydančių baltymų (angl. *single-strand annealing proteins*) šaperonų, asocijuotų su Sup35, lygį. Taigi, ubikvitino sistemos pokyčiai gali daryti įtaką prionams per pagalbinius veiksnius (Liebman ir Chernoff, 2012).

Nors pranešama, kad poliglutamino regionai yra atsparūs proteosominei degradacijai (nors tai taip pat gana prieštaravimai vertinama) (Juenemann et al., 2013), bet Sup35 baltymo gyvavimo laikas *in vivo* yra vidutinis, o tai leidžia manyti, kad jis iš prigimties nėra neįprastai atsparus degradacijai. Kai kurie tyrimai nustatė, kad tam tikri Sup35 priono domenų fragmentai, turtingi QN, rodo aukštus pasenusių baltymų pakeitimo naujais lygius (Kochneva-Pervukhova et al., 1998), ir kad Sup35 prioninis domenai gali būti perskeltas proteolitiškai (Okamoto et al., 2017). Todėl daroma išvada, jog degradacija ir proteolitinės sistemos gali „apdoroti“ Sup35 priono domeną *in vivo*. Visgi, Cascarina ir kolegų, 2018 metais atlikto tyrimo rezultatai išryškino principą, kuris iš esmės skiriasi nuo įgimto baltymo stabilumo teorijos. Konkrečiau, sekos, galinčios sukelti efektyvią degradaciją guaninu turtinguose ir prioninius domenų panašiuose domenuose (angl. *prion-like domains*, PrLD), tam tikru būdu yra apsaugotos nuo proteostazės mechanizmų, dėl aplinkui esančių QN turtingų regionų. Todėl QN liekanos gali sustiprinti priono domenų agregaciją, iš dalies apsaugodamos ir agregaciją linkusias sritis nuo proteostazės mechanizmo. (Cascarina et al., 2018). Nors padažnėjusi degradacija ir agregacija nebūtinai yra alternatyvos (Kochneva-Pervukhova et al., 1998), tyrimo

rezultatai rodo, kad Sup35 prioninio domeno išsidėstymas suteikia atsparumą degradacijai ir išlaiko galimybę formuoti prionus (Cascarina et al., 2018).

Manoma, kad Sup35 priono sritis sudaro sutrikdytą, bet netvarkingą (angl. *collapsed but disordered*) struktūrą, kurioje ir yra didelis QN kiekis, galintis paslėpti hidrofobinius regionus nuo proteostazės mechanizmo. (Mukhopadhyay et al., 2007). Kitu atveju, užuot užkertant kelią hidrofobinių regionų pradiniam atpažinimui proteostazės mechanizmais, QN liekanos gali slopinti tolesnių įvykių seką, sukeliančią degradaciją. Nors didelį QN kiekį Sup35N galima išlaikyti dėl daugelio priežasčių, gali būti, kad stabilizuojantis QN poveikis bent jau prisideda prie pastebėto regionų išsidėstymo išsaugojimo (Cascarina et al., 2018).

Kiti Sup35 prioninio domeno bruožai, be QN kiekio, taip pat atrodo reikalingi, kad būtų išvengta degradacijos mechanizmų aptikimo (Cascarina et al., 2018). Įrodyta, kad šešios aminorūgštys skatina prionų susidarymą (angl. *prion-promoting*): fenilalaninas, tirozinas, triptofanas, valinas, izoleucinas ir metioninas (Toombs et al., 2010). Sup35 priono domene yra 23 šios aminorūgštys ir jos visos, išskyrus inicijuojantį metioniną, yra aromatinės. Taip pat, šios aminorūgštys yra paskirstytos domene ne šalia viena kitos (tik vienoje pozicijoje 2 iš 23 atsiranda greta) ir beveik visos turi gretimas QN aminorūgščių liekanas. Taigi, Sup35 priono sritis turi daug funkcijų, kurios skatina agregaciją, tačiau „vengia“ tam tikrų savybių, galinčių prisidėti prie degradacijos (Cascarina et al., 2018). Be to, šie tendencingumai nėra būdingi tik Sup35 prionų PrD sričiai; dauguma kitų mielių prionų domenų taip pat yra turtingi QN ir turi daug aromatinių aminorūgščių (MacLea et al., 2015).

1.4.4. Kodėl argininas keičia liziną?

Remiantis 2018 metų Olesya O. Panasenko straipsniu, tam, kad tikslinis baltymas būtų siunčiamas degradacijai į proteosomą, jis turi turėti ubikvitino žymę, kuri dažniausiai yra jungiama prie lizino aminorūgščių baltymo N-gale. **1.1 lentelėje** pateikta 10 prioninę formą įgyti galinčių *S. cerevisiae* baltymų. 5-iuose iš jų – Sup35, Mot3, Ure2, Swi1 ir NEW1 – PrD lokalizuojasi N-gale, likusiuose 5-iuose – viduriniajame (M) arba C-gale. Įdomu tai, kad Sup35, Mot3 ir Ure2 N-galuose yra tik po vieną liziną, kurie teoriškai galėtų būti ubikvitilimo taikiniais.

1.1 lentelė. Mielių prionai

Nr.	Baltymas ir jo [prioninė forma]	Ar prioninis domenas yra N-gale?	N domenas (a. r.)	PrD (a. r.)	Lizinių skaičius	Lizinių pozicijos	Šaltinis
1	Sup35 [PSI ⁺]	Taip	1–123	1–123	1	K102	(Uniprot, 2003 (a); Dergalev et al., 2019)
2	Mot3 [MOT ⁺]	Taip	1–295	1–295	1	K67	(Uniprot, 2003 (b); Holmes et al., 2013)
3	Ure2 [URE3]	Taip	1–89	1–89	1	K78	(Uniprot, 2003 (c))
4	Swi1 [SWI ⁺]	Taip	1–323	1–38	4*	K80, K131, K167, K297	(Uniprot, 2003 (d), Goncharoff et al., 2018)
5	NEW1 [NU ⁺]	Taip	1–153	1–153	13	K4, K5, K7, K18, K32, K45, K46, K56, K93, K101, K105, K132, K147	(Tuite, 2000; Uniprot, 2003 (e))
6	Rnq1 [PIN ⁺]	Ne**	1–152	153–405	7	K5, K25, K48, K84, K93, K107, K147	(Tuite, 2000; Uniprot, 2003 (f); Zhouravleva et al., 2023)
7	Cyc8 [OCT ⁺]	Ne	1–398	443–672 (arba 493–587)	11	K81, K151, K175, K185, K198, K202, K244, K259, K280, K287, K389	(Uniprot, 2003 (g); Maqani et al., 2018; Zhouravleva et al., 2023)
8	Sfp1 [ISP ⁺]	Ne	1–229	230–430	6	K58, K71, K100, K167, K197, K201	(Uniprot, 2003 (h); Rogoza et al., 2010; Zhouravleva et al., 2023)
9	Mod5 [MOD ⁺]	Ne	1–193	194–215	18	K3, K7, K14, K15, K27, K37, K52, K60, K104, K122, K127, K132, K136, K155, K163, K181, K184, K185	(Uniprot, 2003 (i); Zhouravleva et al., 2023)
10	Pin3 [LSB ⁺]	Ne	1–112	113–183	8	K21, K36, K41, K76, K80, K86, K93, K109	(Uniprot, 2003 (j); Zhouravleva et al., 2023)

* 4 liziniai N-gale, bet PrD nėra nei vieno.

** Ne, bet dalyvauja prionizacijoje.

Šio darbo tikslas buvo įvesti K102R mutaciją, norint išsiaiškinti, ar tai turi reikšmės ubikvitilino ir proteosominės degradacijos procesams. Jeigu mutotas baltymas prionizuotųsi intensyviau negu natyvus baltymas, galima būtų teigti, kad jo atsparumas proteosominei degradacijai yra didesnis. Tai įrodytų, kad prioninė natyvaus Sup35 baltymo forma visgi yra degraduojama proteosomos, ir vienintelis lizinas N-gale tikrai yra ubikvitino taikinis, o vienas iš atsparumo degradacijai mechanizmų koncentruojasi į šio lizino apsaugojimą.

Kadangi 102-oje pozicijoje esantis lizinas keičiamas į arginą, svarbu paminėti, kad argininas nėra ubikvitino taikinis. Kadangi lizinais kanoniškai sudaro izopeptidinius ryšius su ubikvitinu, mutacijos į aminorūgštis, kurios negali sudaryti šių ryšių, kaip antai argininas, gali leisti identifikuoti lizinus, dalyvaujančius ryšiuose. Tada lizino-arginino mutantai lyginami su originaliais konstruktais, kad būtų galima iširti pakitusius ubikvitilino modelius (Sap ir Reits, 2020). Taip pat, abiem aminorūgštims t.y. lizinui ir argininui, būdingas teigiamas krūvis ir lizinas dažnai dalyvauja druskos tiltelių susidaryme, jungdamasis su neigiamai įkrautomis aminorūgštimis, pvz., aspartatu. Šios sąveikos mechanizmas kuria stabilizuojančius vandenilinius ryšius, kurie gali būti svarbūs baltymų stabilumui (Betts ir Russell, 2007). Pakeitus liziną į nekonservatyvią aminorūgštį, kurios savybės nesutampa su lizino, galėtų keistis Sup35 baltymo struktūra ir / arba funkcijos (Wang et al., 2020). K102R mutacijos įvedimui naudotas vietai specifinės mutagenozės metodas, kuriam atlikti reikėjo keturių skirtingų pradmenų.

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos

2.1.1. Reagentai

Gamintojas – **AppliChem**:

1. LiOAc × 2H₂O.

Gamintojas – **Bio-Rad**:

1. Agarozė;
2. Glicinas;
3. Natrio dodecilsulfatas (toliau NDS);
4. Amonio persulfatas (toliau APS);
5. Tetrametilethilendiaminas (toliau TEMED).

Gamintojas – **CARL ROTH**:

1. Adeninas;
2. Agaras;
3. Agarozė;
4. Akrilamidas;
5. Ampicilinas;
6. Bisakrilamidas;
7. Bromfenolio mėlynasis;
8. CH₄O;
9. CuSO₄;
10. D(+) – gliukozės monohidratas;
11. Dimetilsulfoksidas (toliau DMSO);
12. Glicerolis (86 %);
13. Mielių azoto bazė (angl. *yeast nitrogen base*, toliau YNB) (be aminorūgščių ir nukleotidų);
14. Lizogeninė mitybinė terpė (angl. *lysogeny broth*, toliau LB) (be agaro);
15. L-leucinas;
16. L-triptofanas;
17. Mielių ekstraktas;
18. Peptonas;
19. Roti®Blue (5×);
20. Tris;

21. Uracilas.

Gamintojas – **Invitrogen:**

1. Lašišos spermos DNR;
2. SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard, 4–200 kDa.

Gamintojas – **MERCK:**

1. Acto rūgštis (100 %);
2. $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$;
3. HCl (37 %);
4. $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$;
5. NaCl;
6. NaOH;
7. PEG4000.

Gamintojas – **New England Biolabs (NEB):**

1. BamHI-HF (angl. *high fidelity*, HF);
2. BamHI;
3. CutSmart buffer;
4. SacII;
5. ScaI.

Gamintojas – **Serva:**

1. Etidžio bromidas (toliau EtBr);
2. β-merkaptioetanolis.

Gamintojas – **Sigma – ALDRICH:**

1. Etilendiamintetraacto (toliau EDTA);
2. L-histidinas.

Gamintojas – **Thermo Fisher Scientific:**

1. 5× Phusion™ HF Buffer;
2. CloneJET PCR Cloning Kit;
3. DreamTaq Green PCR Master Mix (2×);
4. Gene Ruler DNA Ladder Mix;

5. GeneJET Gel Extraction Kit;
6. GeneJET Plasmid Miniprep Kit;
7. GeneRuler DNA Ladder, ready-to-use;
8. GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use;
9. Phusion Hot Start High-Fidelity PCR Master Mix;
10. Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase;
11. Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių;
12. T4 DNA Ligase buffer (10×);
13. T4 DNA Ligase LC (angl. *low-copy*, *LC*);
14. TriTrack DNA Loading Dye (6×).

2.1.2. Mielių ir bakterijų kamienai, naudoti kaip rekombinantinės DNR recipientai

- *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] (genotipas: (MATa *ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 ura3-52 leu2-3,112*) [*psi*][*PIN*⁺] (dr. Yury Chernof dovana).
- *E. coli* DH5α (genotipas: *F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*) (Invitrogen).

2.1.3. Plazmidės

Informacija apie tyrime naudotas plazmidės pateikta **2.1 lentelėje**, struktūrinės dalys nurodytos **1 Priede**.

2.1 lentelė. Tyrime naudotos plazmidės

Plazmidė	Atrankos žymuo	Paskirtis	Šaltinis
pRSCupSup35GFP	Ampicilinas	Baltymo sintezė mielių ląstelėse	VU GMC MBK kolekcija
pJET1.2/blunt	Ampicilinas	<i>SUP35K102RGFP</i> klonavimas	Thermo Fisher Scientific

2.1.4. Terpės ir tirpalai

- 10 mM adenino tirpalas (ade);
- 100 mM histidino tirpalas (his);
- 100 mM leucino tirpalas (leu);
- 20 mM uracilo tirpalas (ura);
- 40 mM triptofano tirpalas (trp);
- 4× NDS užnešimo buferis: Tris-HCl 240 mM pH 6,8, glicerolis 40 % (v/v), natrio dodecilsulfatas (NDS) 8 % (w/v), bromfenolio mėlynasis 0,04 % (w/v);
- Ca tirpalas (sterilinamas filtruojant, naudojamas autoklavuotas vanduo): 5 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂;

- LiOAc/TE tirpalas: LiOAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA rūgštis 0,5 mM;
- LB terpė su ampicilinu ir/arba agaru arba be ampicilino ir/arba agaru: mielių ekstraktas 0,5 % (w/v), peptonas 1 % (w/v), NaCl 0,5 % (w/v), priedai: ampicilinas 100 µg/mL; agaras 2 % (w/v);
- Mielių ekstrakto, peptono ir deštrozės terpė (angl. *yeast extract-peptone-dextrose*, toliau YPD) su arba be priedų: gliukozė 2 % (w/v), peptonas 2 % (w/v), mielių ekstraktas 1 % (w/v), priedai: adenino tirpalas 1,5 % (v/v) (YPDA terpė); agaras 2 % (w/v);
- Na tirpalas (sterilinamas filtruojant, naudojamas autoklavuotas vanduo): 5 mM Tris-HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂;
- Sintetinė turtinga terpė (angl. *synthetic complete medium*, toliau SC) su arba be priedų: gliukozė 2 % (w/v), YNB 6,7 g/L, priedai: leucino tirpalas 20 mL/L; adenino tirpalas 15 mL/L; histidino tirpalas 3 mL/L; triptofano tirpalas 10 mL/L; agaras 20 g/L, uracilo tirpalas 10 mL/L;
- Transformacijos mišinys: LiOAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, PEG4000 40 % (w/v);
- Tris-acetato-EDTA buferinis tirpalas (angl. *tris-acetate-EDTA*, toliau TAE): Tris 40 mM, acto rūgštis 20 mM, EDTA 1 mM;
- NDS-Tris-glicino buferis: Tris 25 mM, glicinas 192 mM, NDS 0,1 %, pH 8,3.

2.1.5. Naudoti prietaisai ir įranga

- **Binder** termostatas;
- **Biometra** TI 1 UV-transiliuminatorius;
- **Bio-Rad** T100 termocikleris;
- **Bio-Rad** Mini-PROTEAN Tetra Cell NDS-PAGE analizės sistema;
- **Biosan** termo purtyklė su šaldymo funkcija mikromėgintuvėliams ir PGR mėgintuvėliams (TS-100C);
- **Cleaver Scientific** gelių elektroforezės rezervuaras MultiSUB Choice Trio;
- **DNR Bio-Imaging Systems** vaizduoklis MiniBIS Pro;
- **Eppendorf** biofotometras;
- **Eppendorf** centrifuga 5424;
- **Eppendorf** centrifuga MiniSpin® plus;
- **Eppendorf** mikropipetės;
- **ESCO IBS-R-19-1** purtyklė;
- **GFL 1083** purtyklė;
- **IKA® RH basic 2** magnetinė maišyklė;

- **KERN** svarstyklės ADB;
- **KERN** svarstyklės EG;
- **Mars ScanLaf** laminaras;
- **Sigma** laboratorinė šaldanti centrifuga 3-30K;
- **Thermo Fisher Scientific** centrifuga KR 2.5i;
- **Thermo Fisher Scientific** laminaras Safe2020;
- **Thermo Fisher Scientific** mikrocentrifuga Sprout™;
- **Thermo Fisher Scientific** mikropipetės;
- **Thermo Fisher Scientific** lašelinis bekiuvetis spektrofotometras NanoDrop™ 2000;
- **VELP Scientifica** vorteksas.

2.1.6. Pradmenys

Kuriant mutuotą Sup35 baltymą vietai specifinės mutagenezės metodui sumodeliuoti pradmenys ir sekoskaitai naudoti pradmenys pateikti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Vietai specifinei mutagenizei sukurti pradmenys ir sekoskaitai naudoti pradmenys

Mutagenėzėje naudoti pradmenys					
Pradmuo	Žymėjimas darbe	Ilgis (nt)	T _m (°C)	GC (%)	Antrinė struktūra
Sup35GFP_FW (A)	A	23	67,9	43,5	Labai silpna
Seka	5' – TCAATCAATCAGGATCCATGTCTG – 3'				
Mutageninis_RV (B)	B	30	71	46,67	Labai silpna
Seka	5' – GTTGAAGTTTCTGTAAATTTCCACGGCCACC – 3'				
Mutageninis_FW (C)	C	28	68	41,38	Labai silpna
Seka	5' – GCCGTGGAAATTACAGAAACTTCAACTAC – 3'				
Sup35GFP_RV (D)	D	19	66,3	57,9	Nėra
Seka	5' – TAGGGCGAATTGGAGCTCC – 3'				
Sekoskaitai naudoti pradmenys					
Pradmuo	Žymėjimas darbe	Ilgis (nt)	T _m (°C)	GC (%)	
Sup35GFP_FW (A)	23	67,9	43,5	Labai silpna	
Seka	5' – TCAATCAATCAGGATCCATGTCTG – 3'				
delecija_rev	18	54	50	Labai silpna	
Seka	5' – GGCATCAACATGACCCAT – 3'				
Sup35-check-M249-R	21	62	43	Labai silpna	
Seka	5' – TTCGTCATCCACTTCTTCTC – 3'				

T_m – angl. *melting temperature* – lydymosi temperatūra; GC – guanino ir citozino kiekis.

B ir C pradmenys sumodeliuoti naudojant „SnapGene“ programinę įrangą. Sup35GFP_FW (angl. *forward* – tiesioginis) ir Sup35GFP_RV (angl. *reverse* – atvirkštinis) ir delecija_rev pradmenų modeliai padovanoti kolegos Airido Rudžiansko. Visi naudoti pradmenys užsakyti įmonėje „UAB Nanodiagnostika“.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Plazmidinės DNR skyrimas

Ant agarizuotos LB terpės, papildytos ampicilinu, išsėtos *E. coli* DH5 α kamieno ląstelės su plazmide pRSCupSup35GFP, pJET1.2/bluntSup35K102RGFP arba pRSCupSup35K102RGFP augintos 12–16 val., 37 °C. Iš ant lėkštelės užaugusios bakterijų masės, naudojant plazmidinės DNR skyrimo rinkinį GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific), pagal gamintojo [protokolą](#) išskirta plazmidinė DNR, tirta elektroforezės agarozės gelyje metodu.

2.2.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje

Tyrimo eigoje išskirtos plazmidinės DNR, restrikcijos reakcijų ir PGR produktų vizualizacijai ir analizavimui atlikta elektroforezė agarozės gelyje. Gelis paruoštas reikiamą kiekį agarozės užpilant 1 \times TAE buferiniu tirpalu (paruošto gelio koncentracija 0,8 %). Tirpalas kaitintas mikrobangų krosnelėje keliais etapais, išjungiant pradėjus burbuliuoti, iki kol agarozė pilnai ištirpsta ir tirpalas tampa skaidrus, po to vėsinta iki kol tirpalas pasiekia ~ 50 °C. Į atvėsusį agarozės tirpalą įpiltas EtBr dažas iki galutinės 0,5 μ g/mL koncentracijos, tirpalas supiltas į stačiakampę gelio formelę su šulinėlių plokštele. Sustingęs gelis kartu su formele, be šulinėlių plokštelės, perkeltas į elektroforezės indą su 1 \times TAE buferiu, pilnai apsemiančiu šulinėlius. Į šulinėlius mikropipete užnešti: DNR ilgio žymuo GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific), Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) arba GeneRuler DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific) bei mėginiai sumaišyti su užnešimo dažu TriTrack DNA Loading Dye (6 \times) (Thermo Fisher Scientific).

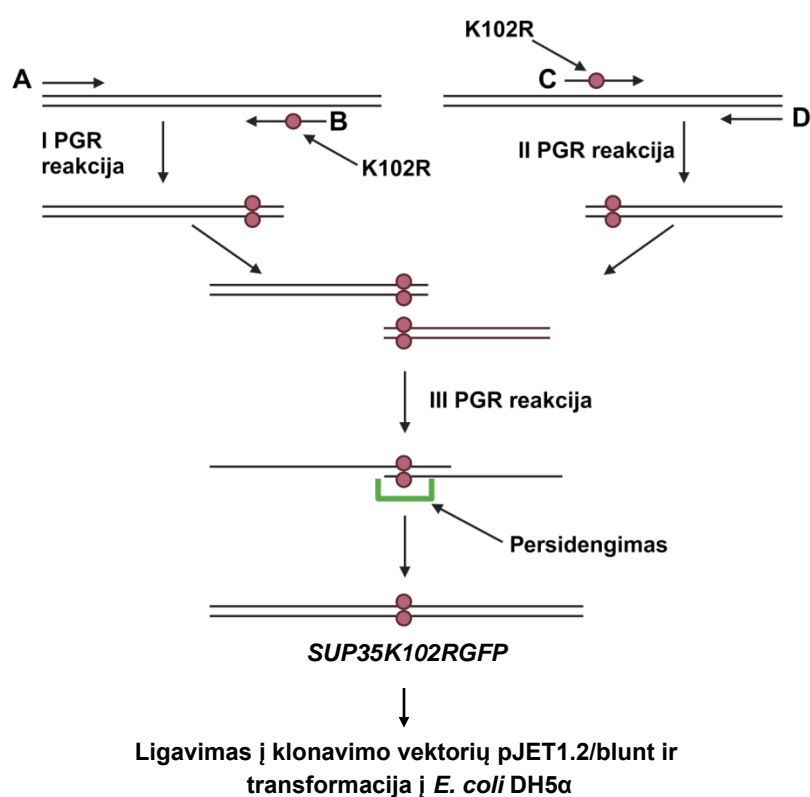
Elektroforezė vykdyta esant 100–120 V įtampai (priklausomai nuo gelio dydžio), 40–50 minučių. Rezultatai vizualizuoti gelį apšviečiant UV šviesa ir naudojant GelCapture programą.

2.2.3. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

Po elektroforezės tiksliniai DNR fragmentai, reikalingi kituose tyrimo etapuose, apšviesti UV šviesa ir išpjauti iš gelio skalpeliu. Siekiant išgryninti išpjautus fragmentus, naudotas GeneJET Gel Extraction Kit rinkinys (Thermo Fisher Scientific), vadovaujantis gamintojo [protokolu](#).

2.2.4. Vietai specifinė mutagenėzė

Sup35 baltymo mutacija K102R įvesta pagal Carrigan ir kolegų 2010 metais aprašytą vietai specifinės mutagenėzės metodą. Šiam tikslui taikytas persidengiančių fragmentų ilginimo PGR metodas, vykdytos trys nepriklausomos PGR reakcijos, kurių mišinio sudėtis ir sąlygos pateiktos **2.3 lentelėje**. Pradmenys A ir D yra sekos, 5' ir 3' galuose (šoniniai pradmenys), juose yra restrikcijos endonukleazių, atitinkamai BamHI ir SacII, kirpimo vietos, B ir C pradmenys persidengia ir apima vieno nukleotido pakaitą K102R (pradmenys pateikti **2.2 lentelėje**). Mutagenėzės schema pateikta **2.1 pav.**



2.1 pav. Vieno nukleotido pakaitos K102R įvedimas vietai specifinės mutagenėzės metodu

Įvykdytos dvi nepriklausomos PGR reakcijos – I ir II – gauti AB (naudoti pradmenys: Sup35GFP_FW ir Mutageninis_RV) ir CD (naudoti pradmenys: Mutageninis_FW ir Sup35GFP_RV) fragmentai. III PGR reakcijos metu AB ir CD fragmentai sujungti į vieną AD (*SUP35K102RGFP*) (naudoti pradmenys: Sup35GFP_FW ir Sup35GFP_RV) fragmentą. Šaltinis: sudaryta darbo autorės, remiantis Castorena-Torres et al., 2016, naudojantis Biorender internetine programa.

2.3 lentelė. PGR mišinio, sudėtis (A) ir sąlygos (B) vietai specifinei mutagenizei atlikti

A) PGR mišinio sudėtis			
Reagentas		Koncentracija	
Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių (Thermo Fisher Scientific)		Iki bendro 50 µL mišinio tūrio	
Phusion master mix (2×) (Thermo Fisher Scientific)		1×	
Pradmuo_FW (A/C)		0,5 µM	
Pradmuo_RV (B/D)		0,5 µM	
DNR matrica*		10–20 ng	
B) PGR sąlygos			
Ciklo stadija	Temperatūra (°C)	Laikas (s)	Ciklų skaičius
Pirminė denatūracija	98	30	1
Denatūracija	98	10	35
Pradmenų prijungimas	64**	10	
Ilginimas	72	43***	
Galutinis ilginimas	72	5 min.	1
	4	∞	

* DNR matrica: I ir II PGR reakcijų metu naudota linearizuota plazmidė pRSCupSup35GFP, III PGR reakcijos metu naudoti AB ir CD fragmentai.

** II PGR reakcijos metu, siekiant gauti CD fragmentą ir parinkus pradmenų prijungimo temperatūrą 64 °C, reakcija nepavyko. Tuomet vykdyta gradientinė PGR reakcija, parinkus temperatūras nuo 49 °C iki 59 °C, visais atvejais reakcijos pavyko. III PGR reakcijos metu, optimali pradmenų prijungimo temperatūra 64 °C.

*** Priklausomai nuo fragmento ilgio (15 s/kbp).

Trijų PGR reakcijų galutinis produktas – mutuotas genas *Sup35K102RGFP*. AB, CD ir *SUP35K102RGFP* fragmentai iš agarozės gelio po elektroforezės išgryninti naudojant GeneJET Gel Extraction Kit rinkinį (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo [protokolą](#). *SUP35K102RGFP* nusiųstas sekoskaitai.

2.2.5. DNR restrikcija endonukleazėmis

Restrikcijos endonukleazės naudotos darbe:

- BamHI-HF arba BamHI (NEB);
- SacII (NEB);
- ScaI (NEB).

DNR restrikcijos mišinys pagamintas pagal gamintojų nurodymus, mišinio sudėtis nurodyta **2.4 lentelėje**.

2.4 lentelė. Trigubos, dvigubos ir viengubos restrikcijos reakcijų mišinių sudėtys

Reakcijos tipas		Triguba restrikcija	Dviguba restrikcija	Vienguba restrikcija
		Reagento kiekis (μL)		
Mišinio komponentas	CutSmart buferis (NEB)	5	5	5
	BamHI-HF arba BamHI (NEB)	1	1	1
	SacII (NEB)	1	1	-
	ScaI (NEB)	1	-	-
	DNR	3	3	3
	Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių (Thermo Fisher Scientific)	39	40	41
Bendras reakcijos tūris		50 μL		

Reakcijos sąlygos optimizuotos: restrikcijos mėginiai 2 val. inkubuoti 37°C. Produktai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu.

2.2.6. Tikslinio geno įterpimas į klonavimo vektorių

Tikslinis fragmentas (*SUP35K102RGFP*) klonuotas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių naudojant CloneJET PCR Cloning Kit rinkinį (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo [protokolą](#). Ligavimo reakciją rinkinyje katalizuoja T4 DNR ligazė. Vektorius rinkinyje yra linearizuotas ir pasižymi bukais fosforilintais galais. Kadangi PGR reakcijose buvo naudota „Phusion Hot Start“ polimerazė (Thermo Fisher Scientific), irgi paliekanti bukus galus, tikslinį fragmentą galima iš karto įterpti į vektorių. *SUP35K102RGFP* sujungtas su vektoriumi dviem skirtingais santykiais (atitinkamai 1:1 ir 2:1). Bakterijos su plazmide, bet be tikslinio fragmento žūva, nes fragmento įterpimo vietoje yra perskirtas toksino genas (Eco47I/T7 restrikcijos endonukleazė). Ligavimo mišinys supilstytas ir 2 val. inkubuotas kambario temperatūroje.

2.2.7. pJET1.2/bluntSup35K102RGFP perkėlimas į kompetentines *E. coli* DH5α bakterijas cheminės transformacijos metodu

Po ligavimo reakcijos pJET1.2/bluntSup35K102RGFP įkeltas į chemiškai kompetentines *E. coli* DH5α ląsteles (paruoštas pagal (Bolivar ir Backman, 1979) karščio šoko metodu. Atliekant cheminę transformaciją pagal Bolivar ir Backman, 200 μL kompetentinių ląstelių sumaišyta su 15 μL vektoriaus-konstrukto DNR (ligavimo mišinio), viskas atlikta ledo vonelėje, tuomet inkubuota 45 min., 4 °C. Ląstelės paveiktos karščio šoku 42 °C, 2 min. Temperatūros pokytis keičia pusiau kristalinės membranos būsenos takumą, pasiekiamą esant 0 °C, padidėja membranos pralaidumas, todėl DNR molekulė gali patekti į ląstelę per adhezijos zoną (Tu, 2008). Tada ląstelės trumpam perkeltos į ledo vonelę, membrana tokiu būdu atgauna jai būdingą takumą. Toliau bakterijos gaivintos, jas suspendavus 500 μL LB terpės, inkubuotos 1 val., 37 °C. Šios inkubacijos metu ląstelės atsigauna po karščio šoko, pasisavina terpėje esančias maistines medžiagas. Ląstelės išsėtos ant agarizuotos LB terpės papildytos ampicilinu: a) 30 μL, b) 70 μL, c) ląstelių likutis (~600 μL) surinktas centrifuguojant ~7000 aps. 2 min., supernatantas (~500 μL) nupiltas, paliekant ~100 μL, ląstelės suspenduotos mikropipete ir paskirstytos ant terpės. Auginta 12–16 val., 37 °C.

Atrinktos transformantų kolonijos klonuotos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu, auginta 12–16 val., 37 °C. Naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) išskirtos plazmidės tikrintos trigubos restrikcinės analizės metodu su BamHI-HF / BamHI (NEB), SacII (NEB) ir ScaI (NEB). Atliekant restrikcijos reakciją tik su BamHI-HF / BamHI (NEB) ir SacII (NEB) gautų tikslinio fragmento ir likusios vektoriaus dalies dydžiai yra labai panašūs, atitinkamai ~2800 bp ir ~2900 bp. Tokiu atveju yra sunku tiksliai iš agarozės gelio po elektroforezės išpjauti *SUP35K102RGFP* fragmentą. Dėl to naudojama ScaI (NEB), kuri likusią vektoriaus dalį sukarpo į ~2100 bp ir ~800 bp dydžio fragmentus. Pasirinkta plazmidė su tiksliniu fragmentu nusiųsta sekoskaitai, o tikslinis fragmentas išpjautas iš agarozės gelio po elektroforezės ir naudotas tolesniuose darbuose.

2.2.8. Tikslinio geno įterpimas į pRSCup „šaudyklinį“ vektorių

SUP35K102RGFP klonuotas į pRSCup šaudyklinį vektorių naudojant T4 DNR ligazę (Thermo Fisher Scientific), kuri katalizuoja ligavimo reakciją pagal gamintojo [protokola](#), skirtą tikslinio fragmento lipniais galais įterpimui į vektorių. Tikslinis fragmentas su vektoriumi maišomi keliais skirtingais santykiais (atitinkamai 1:1, 2:1, 3:1). Ligavimo mišinio reakcijos sąlygos optimizuotos: 2 val. inkubuota kambario temperatūroje, per naktį 4 °C, tuomet mišinys perkeliamas į -20 °C.

2.2.9. pRSCupSup35K102RGFP perkėlimas į kompetentines *E. coli* DH5α bakterijas cheminės transformacijos metodu

SUP35K102RGFP įterptas į pRSCup vektorių ir įkeltas į chemiškai kompetentines *E. coli* DH5α ląsteles (paruoštas pagal (Chen et al., 2001) karščio šoko metodu. Atliekant cheminę transformaciją pagal Chen ir kolegas, 200 μL kompetentinių ląstelių sumaišyta su 5 μL vektoriaus-konstrukto DNR (ligavimo mišinio), viskas atlikta ledo vonelėje, tuomet 30 min. inkubuota 4 °C. Ląstelės paveiktos karščio šoku 2 min., 42 °C. Bakterijos trumpam perkeltos į ledo vonelę, gaivintos su 200 μL LB terpės, inkubuotos 45 min., 37 °C. Tuomet ląstelės išsėtos ant agarizuotos LB terpės papildytos ampicilinu ir augintos 12–16 val., 37 °C.

2.2.10. Bakterijų kolonijų PGR

Po *E. coli* DH5α bakterijų cheminės transformacijos ant LB terpės su ampicilinu užaugusios ląstelių kolonijos analizuotos kolonijų PGR metodu naudojant DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo [protokolą](#) su modifikacijomis. Matricai nuo lėkštelės mikropipetės galu užkabinta pusė užaugusios kolonijos ir suspenduota su 50 μL sterilaus dejonizuoto vandens be nukleazių (Thermo Fisher Scientific). PGR mišinio sudėtis ir sąlygos pateikti 2.6 lentelėje.

2.6 lentelė. Bakterijų kolonijų PGR mišinio sudėtis (A) ir sąlygos (B)

A) PGR mišinio sudėtis			
Reagentas		Koncentracija arba kiekis	
Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių (Thermo Fisher Scientific)		Iki bendro 20 μL mišinio tūrio	
DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific)		1×	
Pradmuo Mutageninis_FW		0,5 μM	
Pradmuo Sup35GFP_RV		0,5 μM	
DNR matrica		2 μL kolonijos suspensijos	
B) PGR sąlygos			
Ciklo stadija	Temperatūra (°C)	Laikas	Ciklų skaičius
Pirminė denatūracija	95	3 min.	1
Denatūracija	95	30 s	35
Pradmenų prijungimas	59	30 s	
Ilginimas	72	2 min.	
Galutinis ilginimas	72	10 min.	1

	4	∞	
--	---	---	--

Po kolonijų PGR, mėginiai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu. Kolonijų PGR metodu tirtos kolonijos klonuotos ant LB terpės papildytos ampicilinu, ir augintos 12–16 val., 37 °C. Tuomet iš bakterijų išskirtos plazmidės naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) ir nusiųstos sekoskaitai.

2.2.11. Kompetentinių *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno mielių ląstelių paruošimas ir cheminė transformacija

Kompetentinių mielių ląstelių paruošimas ir jų cheminė transformacija atlikta remiantis Aitmanaitės ir kolegų, 2021 metų [protokolu](#), jį modifikuojant. *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelės augintos ant agarizuotos YPD terpės 2,5 paros. Tuomet kompetentinės mielių ląstelės paruoštos į 5 mL YPDA terpės perkėlus *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno koloniją iš lėkštelės, auginta 16–20 val., 30 °C, 130 aps./min. Tuomet 500 µL ląstelių perkelta į 50 mL YPDA terpės, auginta 30 °C, 130 aps./min., kol pasiektas optinis tankis 0,7. Ląstelės centrifuguotos 5 min., 1500 ×g, kambario temperatūroje, plautos su 20 mL sterilaus dejonizuoto vandens, centrifuguotos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupiltas, ląstelės užpiltos 2 mL sterilaus dejonizuoto vandens, suspenduotos, perkeltos į 2 mL sterilų mėgintuvėlį, centrifuguotos kambario temperatūroje, 1000×g. Vanduo nupiltas, ląstelės suspenduotos 300 µL sterilaus LiOAc/TE tirpalo.

Vykdyta cheminė transformacija: 100 µL mielių suspensijos sumaišyta su >1 µg plazmidės (pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP (teigiama kontrolė), 20 µL lašišos spermos DNR (Invitrogen), prieš tai ją 10 min. denatūravus 98 °C, ir 600 µL transformacijos mišinio. Mišinys purtytas iki kol tapo homogeniškas. Inkubuota 30 min., 30 °C, 200 aps./min. Tuomet mišinys papildytas 70 µL DMSO, purtytas, kol tapo homogeniškas ir inkubuotas 15 min., 42 °C (karščio šokas), 250 aps./min. Tuomet ląstelės centrifuguotos 30 s, 10000×g, supernatantas nupiltas, ląstelės suspenduotos su 200 µL sterilaus dejonizuoto vandens. 200 µL ląstelių išsėta ant agarizuotos SC terpės be uracilo (toliau SC^{URA-}). Auginta 3–5 paras, 30 °C.

2.2.12. Mielių kolonijų PGR

Po mielių cheminės transformacijos ant SC^{URA-} terpės užaugusios *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno mielių ląstelių kolonijos analizuotos kolonijų PGR metodu, pagal Bergkessel ir Guthrie, 2013, su modifikacijomis. Nuo lėkštelės mikropipetės galu užkabinta pusė užaugusios kolonijos ir suspenduota su kitais reakcijos reagentais. PGR reakcijos mišinio sudėtis ir sąlygos pateiktos **2.7 lentelėje**.

2.7 lentelė. Mielių kolonijų PGR mišinio sudėtis (A) ir sąlygos (B)

A) PGR mišinio sudėtis			
Reagentas		Koncentracija	
Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių (Thermo Fisher Scientific)		Iki bendro 20 μ L mišinio tūrio	
Phusion™ Plus PCR Master Mix (2 \times) (Thermo Fisher Scientific)		1 \times	
Pradmuo Sup35GFP_FW		0,5 μ M	
Pradmuo Sup35GFP_RV		0,5 μ M	
DNR matrica		Pusė kolonijos	
B) PGR sąlygos			
Ciklo stadija	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pirminė denatūracija	98	3 min.	1
Denatūracija	98	30 s	35
Pradmenų prijungimas	60	30 s	
Ilginimas	72	2 min.	
Galutinis ilginimas	72	10 min.	1
	4	∞	

Po kolonijų PGR, mėginiai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu. Atrinktų kolonijų tiksliniai fragmentai *SUP35K102RGFP* ir *SUP35GFP* (teigiama kontrolė) išpjauti iš agarozės gelio, išgryninti naudojant GeneJET Gel Extraction Kit rinkinį (Thermo Fisher Scientific) ir nusiųsti sekoskaitai.

2.2.13. Mėginių paruošimas sekoskaitai

Norint patikrinti ar po III PGR reakcijos gautame galutiniame produkte *SUP35K102RGFP*, plazmidėje pJET1.2/bluntSup35K102RGFP ir plazmidėje pRSCupSup35K102RGFP (išskirtoje iš transformuotų *E. coli* DH5 α) tikrai yra įvesta mutacija K102R, atlikta sekoskaita įmonėse „UAB Nanodiagnostika“ arba „AZENTA Life Sciences“. Po pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP (teigiama kontrolė) plazmidė transformuotų *S. cerevisiae* kolonijų PGR gautas produktas (*SUP35K102RGFP* arba *SUP35GFP*) išgrynintas iš agarozės gelio po elektroforezės naudojant GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį ir taip pat nusiųstas sekoskaitai. Lašeliniu-bekiuvečiu spektrofotometru „NanoDrop“ išmatuota DNR koncentracija ir sugertis. Sekoskaitos reakcijų sudėtys nurodytos 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. Sekoskaitos reakcijų sudėtys

	DNR koncentracija	Pradmuo	Bendras reakcijos tūris (μL)	Įmonė
<i>SUP35K102RGFP</i> (III PGR reakcijos produktas)	15 ng/μL per 100 bp	25 pmol/μL	25	„Nanodiagnostika“
pJET1.2/bluntSup35K102RGFP / pRSCupSup35K102RGFP (<i>E. coli</i>) / <i>SUP35K102RGFP</i> (<i>S. cerevisiae</i>) / <i>SUP35GFP</i> (<i>S. cerevisiae</i> , teigiama kontrolė)	30–100 ng/μL	5 μL	10	„AZENTA Life Sciences“

Sekoskaitai siunčiant III PGR reakcijos produktą *SUP35K102RGFP* naudoti 2.2 lentelėje nurodyti pradmenys Sup35GFP_FW ir delecija_rev (dvi atskiros reakcijos) ir iki 25 μL bendro tūrio papildyta steriliu dejonizuotu vandeniu be nukleazių (Thermo Fisher Scientific). Sekoskaitai siunčiant plazmidę pJET1.2/bluntSup35K102RGFP arba pRSCupSup35K102RGFP, *SUP35K102RGFP* (*S. cerevisiae*) arba *SUP35K102RGFP* (*S. cerevisiae*, teigiama kontrolė) naudotas 2.2 lentelėje nurodytas pradmuo Sup35-check-M249-R ir iki 10 μL bendro tūrio papildyta steriliu dejonizuotu vandeniu be nukleazių (Thermo Fisher Scientific).

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

Vektoriuje pRSCup tikslinis genas (su arba be mutacijos) įterptas šalia vario jonais indukuojamo promotoriaus *CUPI* (Thiele, 1988). Todėl, *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno mielėse, su pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP plazmide, baltymo sintezė indukuota pridodant sterilaus vario sulfato (CuSO₄) iki galutinės 15–100 μM koncentracijos, kultūrai pasiekus optinį tankį lygų 0,7–0,9, 5 mL SC^{URA}- terpės. Indukcija vykdyta 4–24 val. Kaip neigiama kontrolė naudotos to paties kamieno ląstelės netransformuotos nei mutuota, nei nemutuota plazmide. Sąlygos baltymo sintezės indukcijai parinktos pagal Jian Liu et al., 2015 ir Peña et al., 1998.

2.2.15. Visų mielių ląstelės baltymų skyrimas šarminės lizės metodu

Centrifuguojant 5 min., 1500 ×g, kambario temperatūroje, surinkta $2,4 \times 10^8$ mielių ląstelių iš užaugintos kultūros. Supernatantas nupiltas, ląstelės perkeltos ant ledo, suspenduotos 200 μL šalto ir sterilaus 2 M LiOAc tirpalo, 10 min. inkubuota ant ledo. Centrifuguota tomis pačiomis

sąlygomis, supernatantas nupiltas, ląstelės perkeltos ant ledo ir suspenduotos 200 µL šalto 0,4 M NaOH tirpalo. Inkubuota 10 min. ant ledo, centrifuguota tomis pačiomis sąlygomis, tuomet supernatantas nupiltas. Toliau ląstelės suspenduotos 50 µL NDS-PAGE dažo buferio ir virtos 10 min. 100 °C. Mėginiai laikyti –20 °C iki užnešimo į poliakrilamidinį gelį. Baltymų skyrimo šarminės lizės metodu sąlygos parinktos remiantis (Zhang et al., 2011).

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

Išskirti baltymai analizuoti elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis metodu. Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell NDS-PAGE analizės sistemoje paruošti skirstomasis (12 %) ir koncentruojamasis geliai, jų sudėtys nurodytos **2.8 lentelėje**, geliai užpilti NDS-Tris-Glicino buferiu.

2.8 lentelė. Skirstomojo ir koncentruojamojo gelių sudėtys

Reagentai	Medžiagos, mL	
	12 % skirstomasis gelis (50 mL)	Koncentruojamasis gelis (20 mL)
Dejonizuotas vanduo	16,5	13,6
30 % akrilamidas*	20	3,4
1,5 M Tris (pH 8,8) /	12,5	–
1 M Tris (pH 6,8)	–	2,5
10 % NDS	0,5	0,2
10 % APS	0,5	0,2
TEMED	0,02	0,02

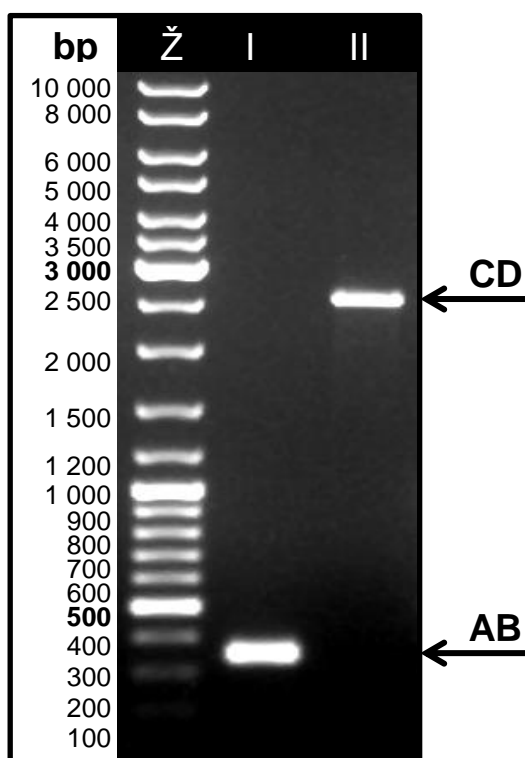
*30 % akrilamidas: 30 % akrilamido ir bisakrilamido tirpalas sumaišytas santykiu 29:1 atitinkamai.

Į šulinėlius užnešta: po 15 µL mėginio bei 10 µL baltymų molekulinio dydžio žymens SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard, 4–200 kDa (Invitrogen). Elektroforezė vykdyta palaikant 10 mA elektros srovės sąlygas, kol mėginyje esantis NDS-PAGE mėlynasis dažas pasiekė skirstomąjį gelį, tada elektros srovės stipris pakeltas iki 20 mA. Baltymų analizės sąlygos NDS-PAGE metodu parinktos remiantis BioRad gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Toliau, gelis vizualizuotas dažant ROTI®Blue (5×) (CARL ROTH) baltymų dažymo tirpalu pagal pateiktas gamintojo rekomendacijas.

3. REZULTATAI

3.1. Vietai specifinė mutagenezė

Keturi skirtingi pradmenys – A, B, C ir D – yra būtini trijų nepriklausomų PGR reakcijų atlikimui. A ir D pradmenys yra sekos, 5' ir 3' galuose (šoniniai pradmenys), juose yra SacII ir BamHI restriktazių atpažinimo ir kirpimo vietos. B ir C persidengia 26 nukleotidais ir apima įvedamą vieno nukleotido pakaitą K102R. Pirmame etape vykdyta I (su A ir B pradmenimis) ir II (su C ir D pradmenimis) nepriklausomos PGR reakcijos, matrica – pRSCupSup35GFP plazmidė. Reakcijų produktai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu, rezultatai pateikti **3.1. pav.**



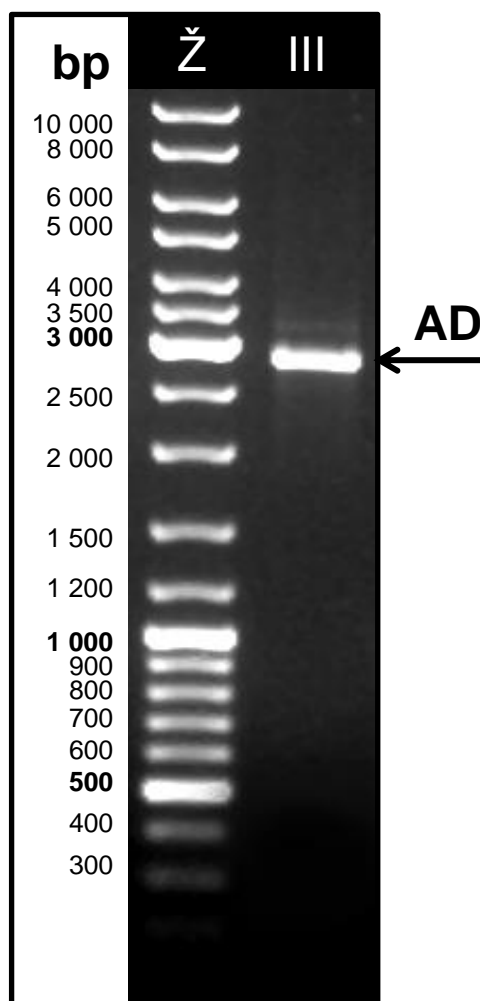
3.1. pav. Dviejų nepriklausomų PGR reakcijų vizualizacija

Ž – DNR ilgio žymuo Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific);

I – AB fragmentas (341 bp);

II – CD fragmentas (2520 bp).

Pradmenys nulemia persidengimo sritį, o pradmenyse yra sekos, ribojamos komplementarių oligomerų ilgio. Bazių pokyčiai įterpti šiuose regionuose leidžia įvykdyti vietai specifinę mutagenezę (Zoller, 1991). Antrame etape vykdyta III PGR reakcija, jos metu fragmentai AB ir CD naudoti kaip matrica, ir šios reakcijos produktas – AB ir CD fragmentai susijungę į AD (2827 bp) fragmentą (*SUP35K102RGFP*), elektroforezės agarozės gelyje rezultatas pateiktas **3.2. pav.**



3.2. pav. III PGR reakcijos produktas

Ž – DNR ilgio žymuo DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific);

III – AB (341 bp) ir CD (2520 bp) fragmentai sujungti į vieną fragmentą su galimai įvesta mutacija K102R – AD (2827 bp) (*SUP35K102RGFP*).

Visos trys PGR reakcijos buvo sėkmingos. Gautas galutinis produktas AD, su galimai įvesta vieno nukleotido pakaita K102R (*SUP35K102RGFP*) nusiųstas sekoskaitai.

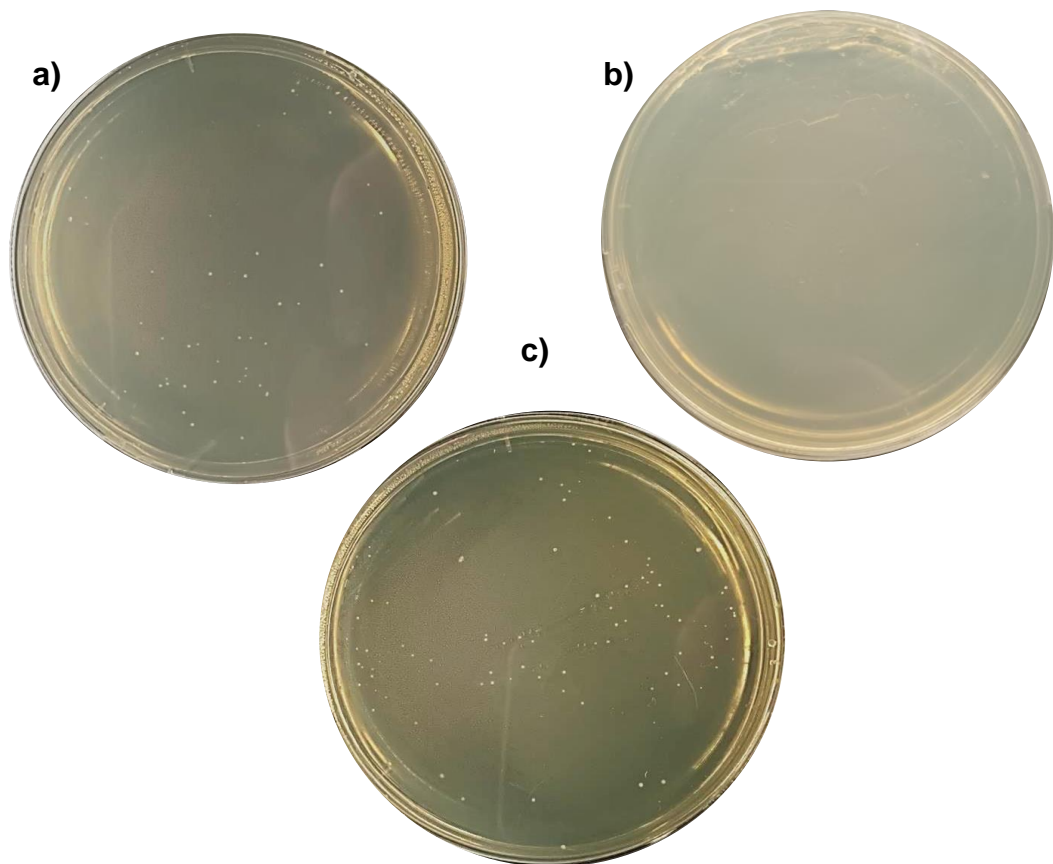
3.2. Tikslinio geno įterpimas į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt ir perkėlimas į chemiškai kompetentines *E. coli* DH5α bakterijas

PGR reakcijoms naudota „Phusion Hot Start“ polimerazė (Thermo Fisher Scientific), dėl to galutiniam III reakcijos produktui *SUP35K102RGFP*, būdingi buki galai. „Šaudyklinis“ mielių raiškos vektorius pRSCup gali būti pagausintas tiek *E. coli* DH5α ląstelėse, dėl jame koduojamo

atsparumo ampicilinui geno *AmpR*, tiek *S. cerevisiae*, dėl jame koduojamo auksotrofinio žymens, geno *URA3* (žr. į. 1 priedas). Kadangi *SacII* restrikcijos endonukleazė, naudota tyrime, specifiskai atpažįsta seką, kurią kerpa, t.y. atlieka restrikciją tik aptikusi dvi tos pačios sekos kopijas (Oller et al., 1991), sudėtinga palaikyti reikiamą vektoriaus ir *SUP35K102RGFP*, santykį. Todėl *SUP35K102RGFP* pirmiausia įkeltas į klonavimo pJET1.2/blunt, o ne į raiškos vektorių pRSCup.

Po ligavimo reakcijos naudojant cheminės transformacijos metodą, į *E. coli* DH5 α bakterijas įterptas pJET1.2/bluntSup35K102RGFP, bakterijos pasėtos ant agarizuotos LB terpės, papildytos ampicilinu.

Transformantai gauti tikslinį fragmentą ir vektorių maišant tiek 1:1, tiek 2:1 santykiais. Inkubuota kambario temperatūroje, nes vektoriaus ir inserto prisijungimas efektyviausias 4–22°C, (Anders et al., 1996). *E. coli* DH5 α ląstelių cheminės transformacijos su plazmide pJET1.2/bluntSup35K102RGFP ir su pRSCupSup35GFP (teigiama kontrolė) rezultatai pateikti 3.3 pav.



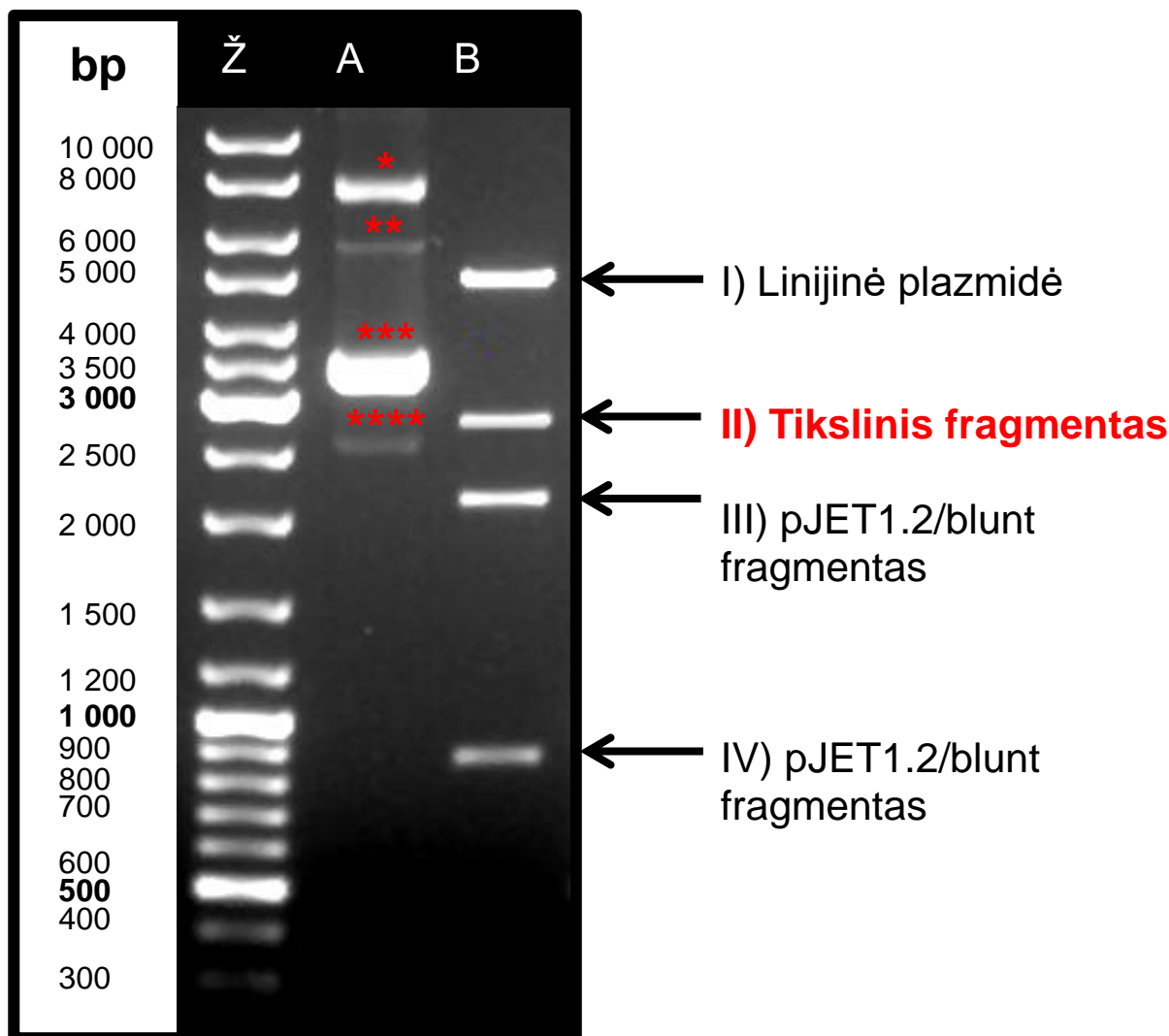
3.3 pav. *E. coli* DH5 α kamieno ląstelių kolonijos po cheminės transformacijos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu

a) pRSCupSup35GFP plazmide transformuotos bakterijų kolonijos (teigiama kontrolė, 42 kolonijos);

b) ant lėkštelės išsetos bakterijos nebuvo transformuotos jokia plazmide (neigiama kontrolė);

c) pJET1.2/bluntSup35K102RGFP plazmide transformuotos bakterijų kolonijos (95 kolonijos).

Atrinktos kolonijos klonuotos ant agarizuotos LB terpės papildytos ampicilinu, ir augintos 12–16 val., 37 °C. Tuomet iš bakterijų išskirtos plazmidės naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Toliau, su išskirtomis plazmidėmis atlikta restrikcijos reakcija, siekiant atskirti *SUP35K102RGFP* fragmentą nuo pJET1.2/blunt plazmidės ir įsitikinti, kad plazmidės fragmentai atitinka teorinius dydžius. Atlikta triguba restrikcijos reakcija su fermentais: ScaI (NEB), SacII (NEB) bei BamHI-HF (NEB) restrikcijos mišinio sudėtis nurodyta **2.5 lentelėje (triguba restrikcija)**. Atrinktos tolimesniems darbams plazmidės elektroforezės agarozės gelyje vizualizacija pateikta **3.4 pav.**

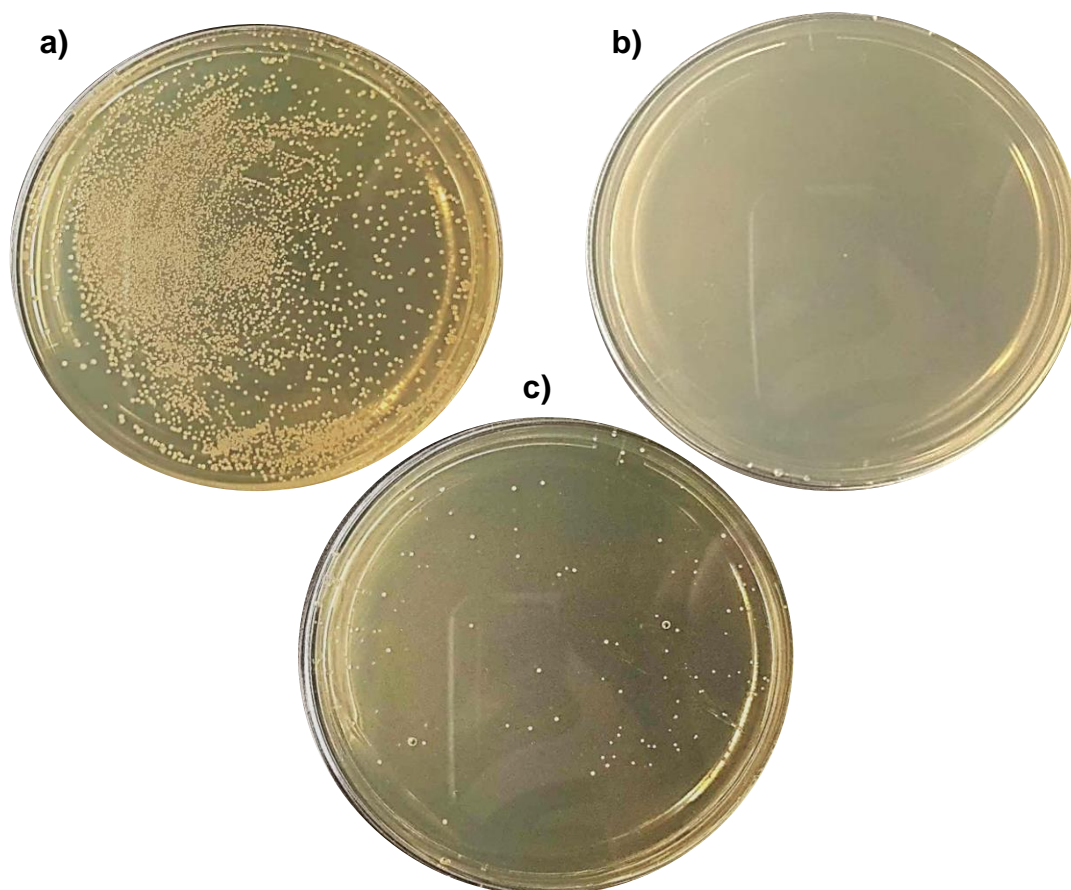


3.4 pav. Iš *E. coli* DH5 α , transformuotų pJET1.2blunt/Sup35K102RGFP plazmidė, išskirtos plazmidės restrikcinės analizės produktai vizualizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu Ž – DNR ilgio žymuo Gene Ruler DNA Ladder mix (Thermo Fisher Scientific); A – pJET1.2blunt/Sup35K102RGFP plazmidė, neveikta restrikcijos endonukleazėmis; **(1)** turinti viengrandį trūkį (*nikuota*), **(2)** linijinė, **(3)** superspiralizuota, **(4)** žiedinė viengrandė – plazmidinės DNR konformacijos; B – mėginys po restrikcijos reakcijos; **I** – linearizuota plazmidė (~5800 bp); **II** – tikslinis fragmentas *SUP35K102RGFP* (~2800 bp); **III** – ~2100 bp dydžio fragmentas; **IV** – ~800 bp dydžio fragmentas.

Kadangi B takelyje matomi trys fragmentai atitinkantys teorinius dydžius, apskaičiuotus remiantis naudotų restrikcijos fermentų kirpimo vietomis, atrinkta plazmidė nusiųsta sekoskaitai, o *SUP35K102RGFP* (~2800 bp) fragmentas išpjautas skalpeliu iš agarozės gelio, išgrynintas naudojant GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) ir naudotas perklonavimui į pRSCup „šaudyklinį“ mielių vektorių.

3.3. Tikslinio geno įterpimas į pRSCup „šaudyklinį“ mielių vektorių ir transformacija į chemiškai kompetentes *E. coli* DH5α ląsteles

E. coli DH5α bakterijos transformuotos naudojant cheminės transformacijos metodą, ligavimo reakcijos produktu pRSCupSup35K102RGFP ir pRSCupSup35GFP (teigiama kontrolė). Po cheminės transformacijos, bakterijos persėtos ant agarizuotos LB terpės, papildytos ampicilinu. *E. coli* DH5α ląstelių cheminės transformacijos rezultatai pateikti 3.6 pav., paveikslo c) dalyje pavaizduota lėkštelė, iš kurios iš atrinktos kolonijos išskirta plazmidė naudota tolesniuose darbuose.



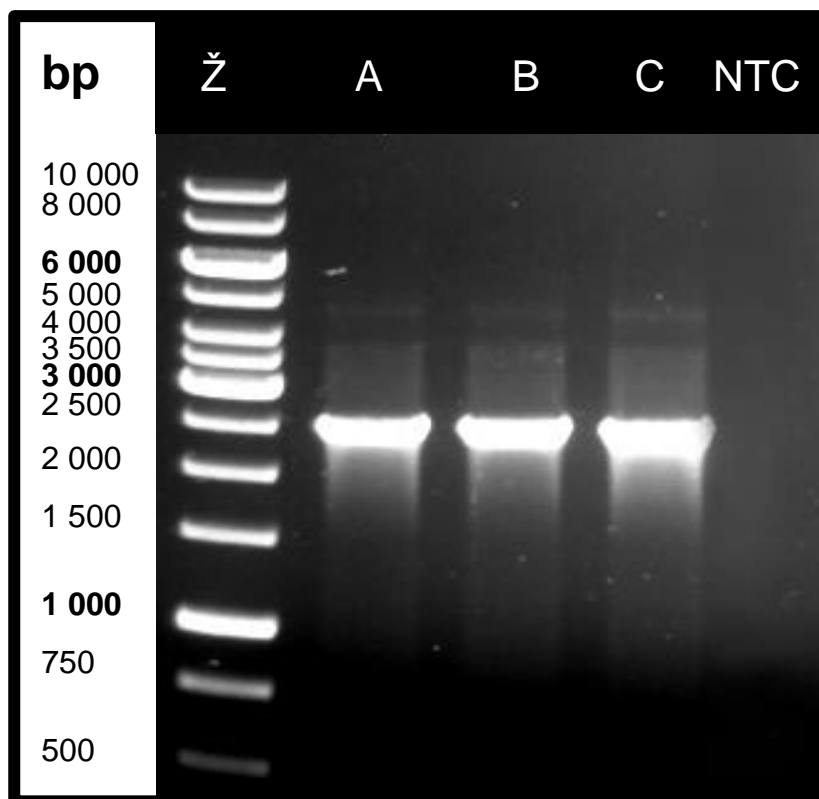
3.6 pav. *E. coli* DH5α kamieno ląstelių kolonijos po cheminės transformacijos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu

a) pRSCupSup35GFP plazmide transformuotos bakterijų kolonijos (teigiama kontrolė, 658 kolonijos);

b) ant lėkštelės išsėtos bakterijos nebuvo transformuotos jokia plazmide (neigiama kontrolė);

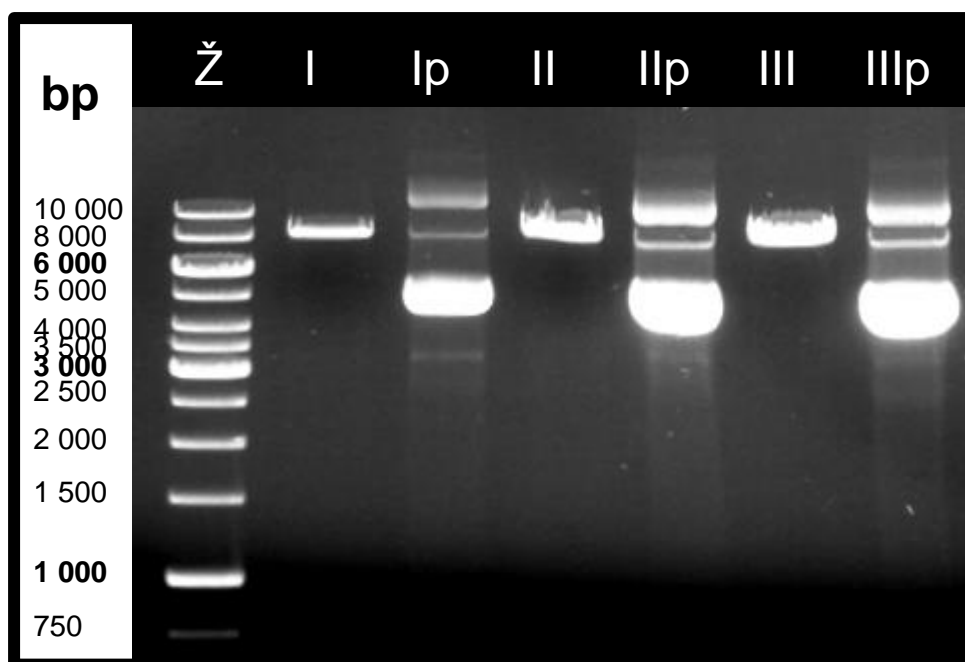
c) pRSCupSup35K102RGFP plazmide transformuotos bakterijų kolonijos (110 kolonijų).

Trys atrinktos kolonijos tirtos kolonijų PGR metodu. PGR reakcijos produktai vizualizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu ir pateikti **3.7 pav.**



3.7 pav. *E. coli* DH5 α , transformuotų pRSCupSup35K102RGFP plazmide kolonijų PGR, produktai vizualizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu
Ž – DNR ilgio žymuo GeneRuler DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific);
A–C – kolonijų PGR produktai (~2500 bp);
NTC – PGR mišinys be DNR matricos.

Kolonijų PGR metodu tirtos kolonijos klonuotos ant LB terpės papildytos ampicilinu, ir augintos 12–16 val., 37 °C. Tuomet iš bakterijų išskirtos plazmidės linearizuotos atliekant restrikcijos reakciją su BamHI (NEB), restrikcijos mišinio sudėtis nurodyta **2.5 lentelėje (vienguba restrikcija)**, siekiant įsitikinti, kad plazmidžių dydis atitinka teorinį. Po restrikcijos mėginiai analizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu, rezultatai pateikti **3.8 pav.**

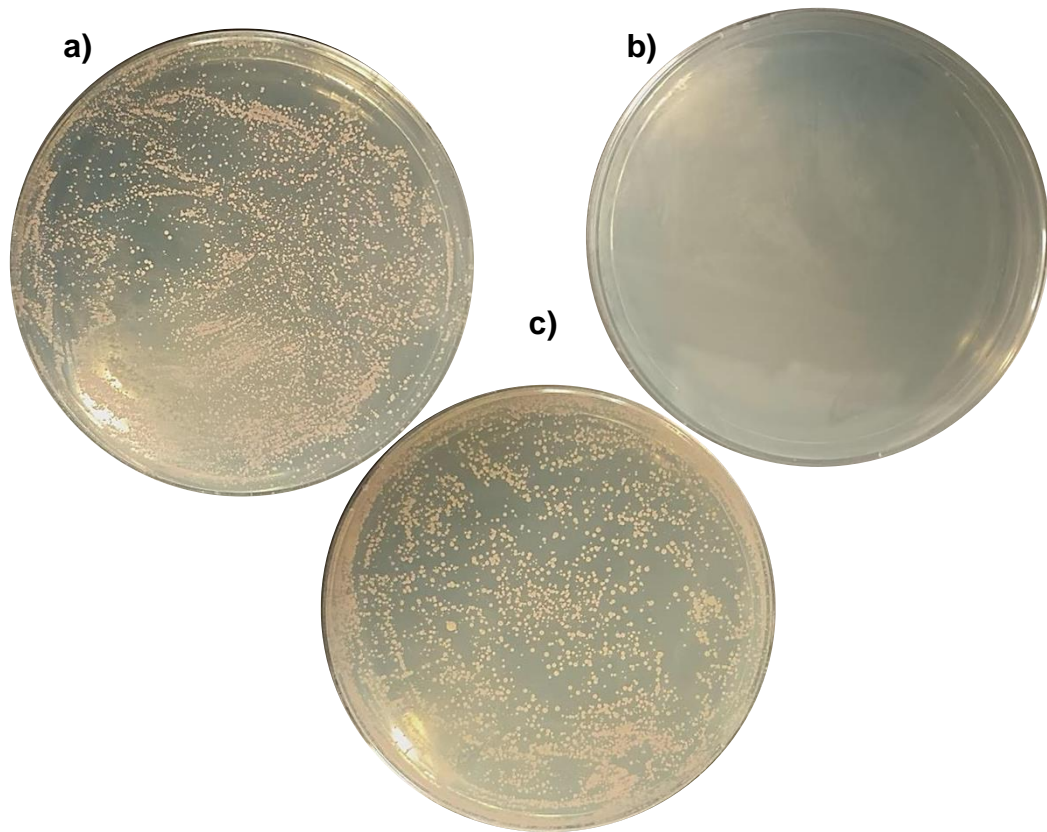


3.8 pav. Restrikcijos reakcijos su BamHI (NEB) produktai
Ž – DNR ilgio žymuo GeneRuler DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific);
I–III restrikcijos reakcijų produktai;
Ip–IIIp – restriktrazėmis neveiktos plazmidės išskirtos iš chemiškai transformuotų *E. coli* DH5a bakterijų.

Tolesniems darbams pasirinkta „III“ pažymėta pRSCupSup35K102RGFP plazmidė. Ji nusiūsta sekoskaitai ir naudota *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelių transformacijoje.

3.4. Mielių kolonijų PGR

Atlikta *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelių transformacija pRSCupSup35K102RGFP ir pRSCupSup35GFP (teigiama kontrolė) plazmidėmis. Šiam kamienui yra būdinga mutacija *ura3–52*, leidžianti atskirti mielių ląsteles pagal jų auksotrofines savybes. Ura3 (angl. *orotidine 5'-phosphate decarboxylase*) baltymas dalyvauja *de novo* pirimidinų biosintezės kelyje (UniProt, 2003 (k), dėl mutacijos naudoto kamieno mielės negali sintetinti uracilo, todėl vektoriai, kuriuose yra *URA3* geno kopija be delecijos, kaip šiame darbe naudotas vektorius pRSCup, leidžia mielėms augti terpėje be uracilo, pavyzdžiui, SC^{URA-}. Rezultatai gauti transformuojant *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno mielių ląsteles cheminės transformacijos metodu pateikti **3.9 paveiksle**. Paveikslo c) dalyje matyti Petri lėkštelė, iš kurios atrinkta mielių koloniją naudota tolesniuose darbuose.



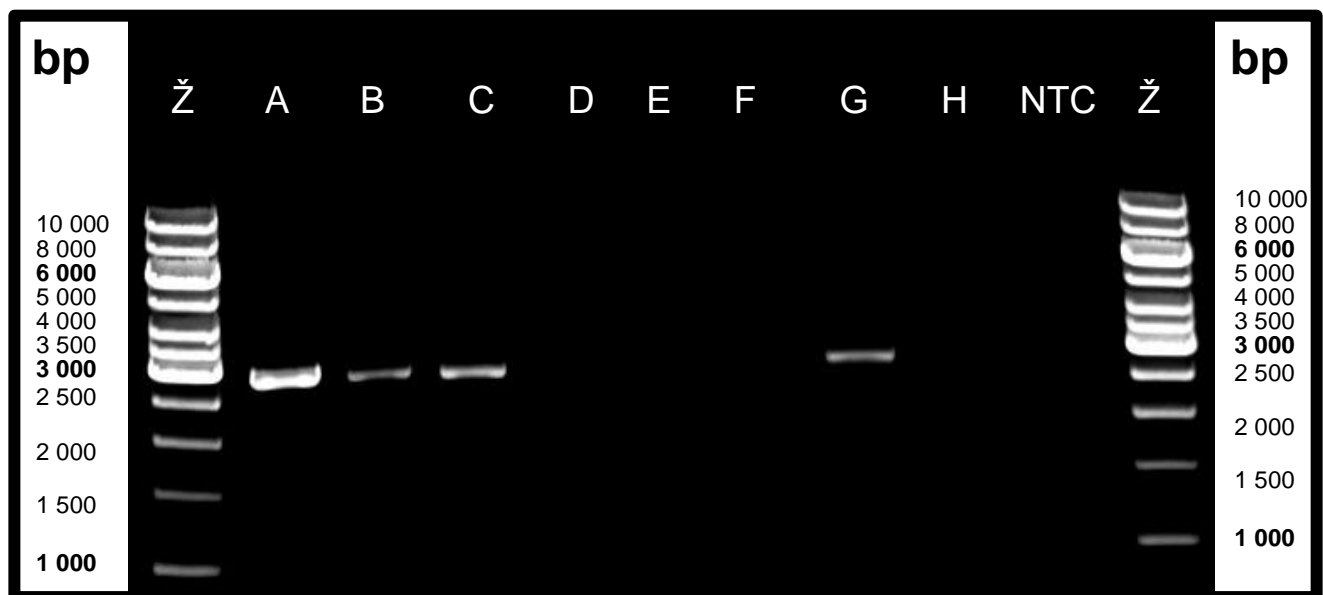
3.9 pav. *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno mielių kolonijos po cheminės transformacijos ant agarizuotos SC^{URA-} terpės

A – mielės transformuotos plazmide pRSCupSup35GFP (~7000 kolonijų);

B – mielės netransformuotos jokia plazmide (neigiama kontrolė);

C – mielės transformuotos plazmidės pRSCupSup35K102RGFP (~6000 kolonijų).

Norint įsitikinti, kad vektorius pRSCupSup35GFP arba pRSCupSup35K102RGFP pateko į mielių ląsteles, atlikta mielių, užaugusių ant agarizuotos SC^{URA-} terpės, kolonijų PGR. Gautų PGR reakcijų produktai elektroforezės agarozės gelyje pateikti **3.10 pav.**



3.10 pav. Mielių kolonijų PGR produktų analizės elektroforezės agarozės gelyje rezultatai
Ž – DNR ilgio žymuo GeneRuler DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific);
A–E – kolonijų, transformuotų pRSCupSup35K102RGFP plazmide PGR produktai;
A–C takeliuose matyti tikslinis fragmentas *SUP35K102RGFP* (~2500 bp);
F–H – kolonijų, transformuotų pRSCupSup35GFP plazmide PGR produktai;
G takelyje matyti tikslinis fragmentas *SUP35GFP*;
NTC – PGR mišinys be matricos.

Remiantis **3.10 paveikslu** galima daryti išvadą, kad *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi⁻*][*PIN⁺*] kamieno mielių ląstelių cheminė transformacija plazmide pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP buvo sėkminga. Tolesniems darbams pasirinktos kolonijos, kurių PGR produktai pažymėti „A“ ir „G“ raidėmis, jie iš gelio išpjauti skalpeliu, išgryninti naudojant GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) ir nusiųsti sekoskaitai.

Tyrimo metu pastebėta, jog plazmidė pRSCupSup35K102RGFP pateko į trijų, iš penkių nagrinėtų, kolonijų ląsteles, A–C takeliuose, o pRSCupSup35GFP plazmidė į vienos, iš trijų nagrinėtų, kolonijų ląsteles. D, E, F ir H takeliuose, tirtose kolonijose, transformacijos metu insertas, *SUP35K102RGFP* arba *SUP35GFP*, galimai pasišalino iš pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP plazmidės ir vektorius pRSCup susiligavo su savimi (angl. *self-ligation*) (be *SUP35K102RGFP* arba *SUP35GFP* fragmento) (Ford, 2015). Taip pat, žinoma, kad ant transformuotų mielių kolonijų su plazmide geba augti mielės be plazmidės, nes žuvusios mielių ląstelės į aplinką paskleidžia savo ląstelių turinį, kuriuo gali pasinaudoti kitos mielių ląstelės (Carmona-Gutierrez et al., 2010). Tai irgi galėjo būti tuščių takelių (D, E, F ir H) priežastimi.

3.5. Sekoskaitos rezultatai

Sekoskaitai buvo išsiųstas III PGR reakcijos produktas *SUP35K102RGFP* genas, plazmidė pJET1.2/bluntSup35K102RGFP išskirta iš transformuotų *E. coli* DH5 α , plazmidė pRSCupSup35K102RGFP išskirta iš transformuotų *E. coli* DH5 α , *S. cerevisiae* kolonijų PGR produktas *SUP35K102RGFP* arba *SUP35GFP* (teigiama kontrolė), išgrynintas iš agarozės gelio po elektroforezės. Prieš kiekvieną mėginių ruošimą sekoskaitai lašeline bėkiu spektrofotometru „NanoDrop“ išmatuota DNR koncentracija ir sugertis. Rezultatai pateikti **3.1 lentelėje**

3.1 lentelė. Plazmidės koncentracija ir sugertis

Mėginio pavadinimas	DNR koncentracija (ng/ μ L)	Sugertis	
		A260/280	A260/230
<i>SUP35K102RGFP</i> (III PGR reakcijos produktas)	20	2,09	0,03
pJET1.2/bluntSup35K102RGFP	295,6	1,94	2,03
pRSCupSup35K102RGFP (<i>E. coli</i>)	651	1,89	2,2
<i>SUP35K102RGFP</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	20,1	2,21	0,03
<i>SUP35GFP</i> (<i>S. cerevisiae</i> , teigiama kontrolė)	18,3	2,17	0,04

DNR sugertis A260/280 ~1,8 laikoma, kad DNR yra „švari“, t.y. mėginyje po DNR išskyrimo nėra baltymų ar fenolių pėdsakų (Matlock, 2015). pJET1.2/bluntSup35K102RGFP ir pRSCupSup35K102RGFP (išskirtų iš transformuotų *E. coli* DH5 α) sugertis A260/280 leidžia manyti, kad mėginiai „švarūs“. *SUP35K102RGFP* (III PGR reakcijos produkto), *SUP35K102RGFP* (*S. cerevisiae*) ir *SUP35GFP* (*S. cerevisiae*, teigiama kontrolė) sugertis ties A260/280 viršija 2, kas rodo, kad DNR nėra „švari“, tačiau to priežastys dar nėra išaiškintos (Matlock, 2015).

DNR sugertis A260/230 2,0–2,2 rodo, kad mėginys nėra užterštas fenoliais ar druskomis, kurie gali palikti pėdsakus po DNR gryninimo iš gelio arba po plazmidinės DNR skyrimo (Matlock, 2015). pJET1.2/bluntSup35K102RGFP ir pRSCupSup35K102RGFP (išskirtos iš transformuotų *E. coli* DH5 α) sugertis A260/230 patenka į 2,0–2,2 intervalą. *SUP35K102RGFP* (III PGR reakcijos produkto), *SUP35K102RGFP* (*S. cerevisiae*) ir *SUP35GFP* (*S. cerevisiae*, teigiama kontrolė) ne. Visi trys fragmentai buvo gauti po PGR reakcijų ir gryninti naudojant GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Vienas iš gryninimo etapų yra agarozės gelio su tiksliniu fragmentu tirpinimas surišimo buferyje (angl. *binding buffer*), į kurio sudėtį įeina guanidino tiocianatas, kurio sugertis irgi yra ties A230 (Matlock, 2015).

Sekoskaitos rezultatų palyginimas sukurtas naudojantis internetine programa Benchling. Analizės rezultatai pateikti **3.11 pav.**

A)	Sup35 (natyvi baltymo nukleorūgščių seka) SUP35K102RGFP (III PGR reakcijos produktas) pJETSup35K102RGFP (<i>E. coli</i>) pRSCupSup35K102RGFP (<i>E. coli</i>) SUP35K102RGFP (<i>S. cerevisiae</i>) SUP35GFP (<i>S. cerevisiae</i> , teigiama kontrolė)	2072 GGCCGTGGAAATTACAAA GGCCGTGGAAATTACAGA GGCCGTGGAAATTACAGA GGCCGTGGAAATTACAGA GGCCGTGGAAATTACAGA GGCCGTGGAAATTACAAA	2104 AACTTCAACTACAAT AACTTCAACTACAAT AACTTCAACTACAAT AACTTCAACTACAAT AACTTCAACTACAAT AACTTCAACTACAAT
B)	Natyvi Sup35 baltymo nukleorūgščių seka	GGCCGTGGAAATTACAAA	AACTTCAACTACAAT
		2,080	2,100
	Natyvi Sup35 baltymo aminorūgščių seka		
	SUP35K102RGFP (<i>S. cerevisiae</i>)	GGCCGTGGAAATTACAGA	AACTTCAACTACAAT
		2,080	2,100
	SUP35K102RGFP (<i>S. cerevisiae</i>) aminorūgščių seka		

3.11 pav. Sekoskaitos analizė naudojant Benchling internetinę programą

A) Natyvios Sup35 baltymo sekos palyginys su po sekoskaitos gautomis sekomis. 2088 nukleotidas pRSCupSup35GFP plazmidėje – adeninas – vietai specifinės mutagenezės metodu pakeistas į guaniną (*SUP35K102RGFP*). Rezultatai parodė, kad mutacija išliko visuose šio darbo etapuose.

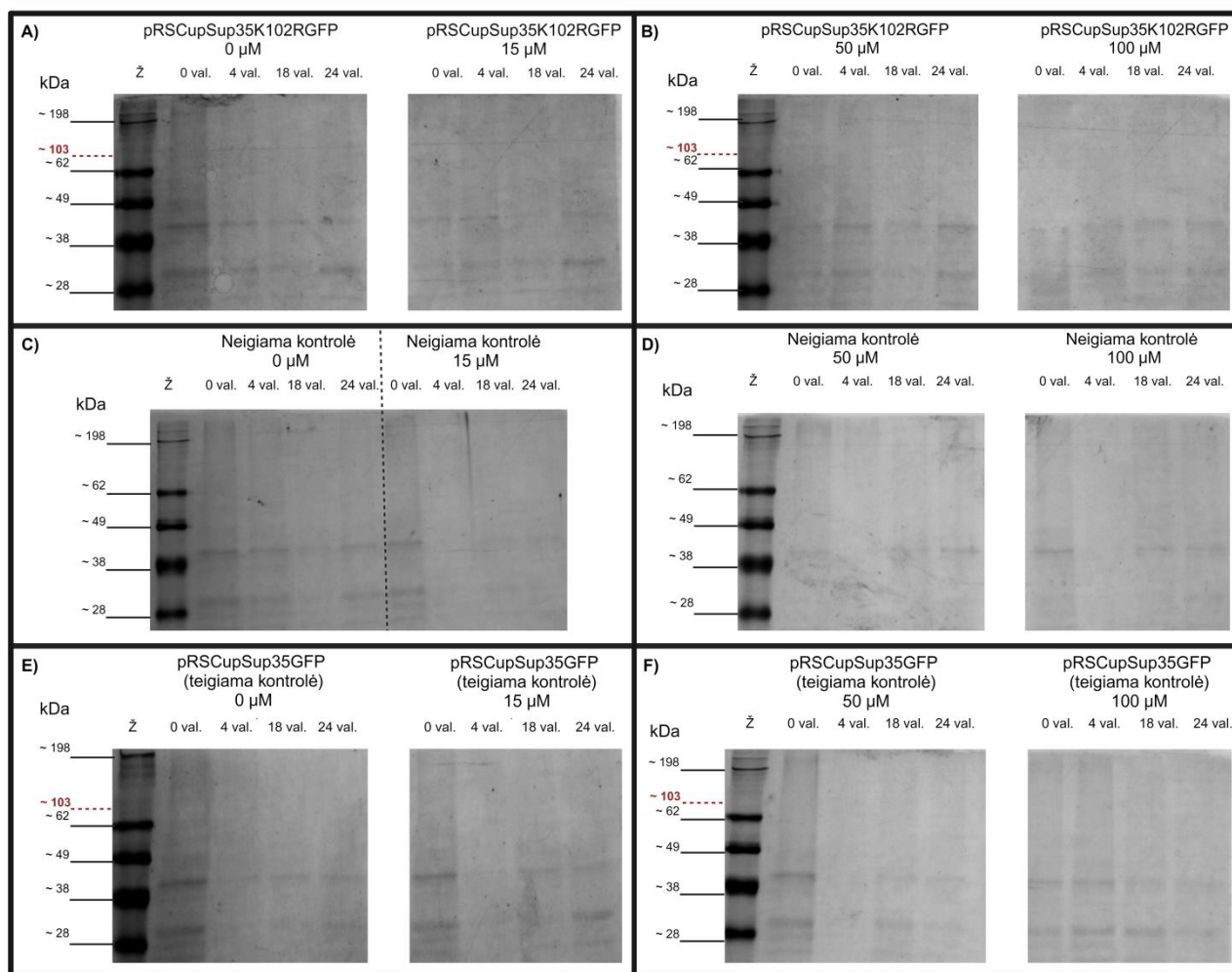
B) Natyvaus Sup35 baltymo 102 padėtyje esančią aminorūgštį liziną (K), koduoja tripletas „AAA“, įvedus vieno nukleotido pakaitą *SUP35K102RGFP* gene (gautame iš *S. cerevisiae* po kolonijų PGR) tripletas „AGA“ koduoja argininą (R). Paveikslas suredaguotas naudojantis Biorender internetine programa.

Geno fragmento sekoskaitos rezultatai ir analizė Benchling internetine programa parodė, kad vietai specifinės mutagenezės metodu pavyko įvesti vieno nukleotido pakaitą *SUP35* gene. Buvo sukurtas mielių baltymo Sup35 variantas K102R.

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

Sup35 baltymo mutantinio varianto K102R sintezės įvertinimui *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse, mielės augintos su pRSCupSup35K102RGFP arba su pRSCupSup35GFP plazmide, arba be plazmidės (neigiama kontrolė), su skirtingomis induktoriaus (CuSO₄) koncentracijomis (15 μM, 50 μM, 100 μM) arba be induktoriaus, skystoje SC^{-URA} arba SC (neigimai kontrolei) terpėje, 4–24 val. Ląstelių mėginiai paimti prieš įdedant induktorių (0 val.), po 4 val., 18 val. ir 24 val. augimo su arba be induktoriaus. Šarminės lizės metodu iš šių mėginių

išskirti visi ląstelės baltymai, toliau baltymai analizuoti NDS-PAGE metodu, rezultatai pateikti **3.12 pav.**



3.12 pav. *S. cerevisiae* 74–D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno mielių ląstelių baltymų analizė NDS-PAGE metodu

Ž (A–F) – baltymų dydžio žymuo SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard, 4–200 kDa (Invitrogen);

A ir B (neigiama kontrolė) – mielių ląstelių, su pRSCupSup35K102RGFP plazmide, augintų su skirtingomis vario sulfato koncentracijomis (A – 0 μM ir 15 μM, B – 50 μM ir 100 μM, 0 val., 4 val., 18 val., 24 val., SC^{-URA} terpėje, baltymų mėginiai, raudona punktyrine linija žymi ~103 kDa, ties šia riba turėti matytis tikslinį baltymą Sup35K102RGFP leidžianti identifikuoti juostelė;

C ir D – mielių ląstelių, be jokios plazmidės, augintų su skirtingomis vario sulfato koncentracijomis (C – 0 μM ir 15 μM, D – 50 μM ir 100 μM, 0 val., 4 val., 18 val., 24 val., SC terpėje, baltymų mėginiai;

E ir F (teigiama kontrolė) – mielių ląstelių, su pRSCupSup35GFP plazmide, augintų su skirtingomis vario sulfato koncentracijomis (E – 0 μM ir 15 μM, F – 50 μM ir 100 μM, 0 val., 4 val., 18 val., 24 val., SC^{-URA} terpėje, baltymų mėginiai, raudona punktyrine linija žymi ~103 kDa, ties šia riba turėti matytis tikslinį baltymą Sup35GFP leidžianti identifikuoti juostelė.

Sup35K102RGFP arba Sup35GFP baltymas yra ~103 kDa dydžio, dėl to analizuojant NDS-PAGE rezultatus, tikėtasi poliakrilamidinio gelio dalyje, kurioje pagal baltymų molekulinio dydžio žymenį turėtų būti išsidėstę panašaus dydžio baltymai, pastebėti ryškesnę mutuoatą ar nemutuoatą baltymą žyminčią juostelę. Rezultatas įrodyta, jog tiek Sup35K102RGFP, tiek Sup35GFP baltymo sintezė nevyksta arba baltymo mielių ląstelės pagamina mažai, jas auginant 4–24 val., SC^{URA} terpėje (mielės su pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP plazmide) arba SC terpėje (mielės be plazmidės, neigiama kontrolė) su skirtingomis induktoriaus koncentracijomis (15–100 μM). Taip pat, visų ląstelės baltymų skyrimui pasirinktas šarminės lizės metodas galėjo būti nepakankamai jautrus. Šios išvados padarytos, nes visuose takeliuose baltymų profiliai beveik identiški ir ties ~103 kDa molekulinio baltymo dydžio žyme nematyti išryškėjusios juostelės.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Tyrimo metu pavyko sukurti mielių *S. cerevisiae* Sup35 baltymo mutantinį variantą K102R. Tai buvo atlikta vykdant tris nepriklausomas PGR reakcijas, su keturiais pradmenimis, iš kurių du persidengia ir apima vieno nukleotido pakaitą. Taip sukurtas mutantinis genas *SUP35K102RGFP*, kuris vėliau buvo įliguotas į kopijinį vektorių pJET1.2/blunt ir plazmide pJET1.2/bluntSup35K102RGFP transformuotos *E. coli* DH5 α ląstelės. Tada *SUP35K102RGFP* genas restrikcijos fermentų pagalba buvo iškirptas iš pastarosios plazmidės, įliguotas į „šaudyklinį“ mielių vektorių pRSCup ir plazmide pRSCupSup35K102RGFP buvo transformuotos *E. coli* DH5 α bei *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] ląstelės. Po kiekvieno etapo atliktos sekoskaitos rezultatai įrodė, kad sukurti mutantinį Sup35 baltymo variantą pavyko ir jis nebuvo prarastas. Toliau, siekiant įvertinti mutuoto ir nemutuoto genų raišką *S. cerevisiae* 74-D694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse, atlikta Sup35K102RGFP ir Sup35GFP baltymų sintezės indukcija vario jonais. Rezultatai parodė, kad tikslinio baltymo sintezė nevyksta arba mielių ląstelės pagamina jo labai nedaug, kad būtų pastebėti reikšmingi skirtumai NDS-PAGE gelyje. Galimos dvi priežastys, kodėl tikslinio mutuoto ar nemutuoto baltymo sintezė nevyksta arba vyksta žemu dažniu: neefektyvi *CUPI* promotoriaus indukcija ir / arba nesėkmingas visų ląstelės baltymų skyrimas. Taip pat, galėjo būti pasirinktas nepakankamai jautrus visų ląstelės baltymų skyrimo metodas, dėl to gauti rezultatai nėra tikslūs.

CUPI genas koduoja nedidelį, cisteinu turtingą, Cu (I) jonus surišantį metalotioneiną, medijuojantį atsparumą didelėms vario ir kadmio koncentracijoms. Ląstelėms yra svarbu palaikyti vario jonų homeostazę, nes nedidelės vario koncentracijos yra būtinos ląstelių išgyvenimui, tačiau per didelės yra toksiškos (Rutherford ir Bird, 2004). Nustatyta, kad vario koncentracijos < 10 μ M yra naudingos ir būtinos mielių fermentų funkcionavimui; 10–50 μ M vario koncentracijos sukelia metabolizmą slopinantį efektą, dėl to sulėtėja mielių augimas; > 100 μ M vario koncentracijos sukelia toksišką efektą mielių metabolizmui, neigiamai paveikiamas augimas, sukeliama ląstelinės pažaidos dėl reaktyviųjų deguonies formų atsiradimo (Ruta ir Farcasanu, 2021). Tyrimo metu pasirinktos kelios skirtingos induktoriaus (CuSO_4) koncentracijos – 15 μ M, 50 μ M ir 100 μ M. Tokios koncentracijos galėjo būti per mažos (15 μ M) arba per didelės (50 μ M ir 100 μ M), ir paveikti *CUPI* promotoriaus indukcijos efektyvumą tiriamo kamieno mielėse. Šį tyrimo etapą reikėtų pakartoti su < 10 μ M CuSO_4 koncentracijomis bei su tarpinėmis 15–50 μ M CuSO_4 koncentracijomis.

Be to, patiriamas bendras ląstelių stresas, esant per didelei vario koncentracijai, gali slopinti indukciją. Pavyzdžiui, per didelis CuSO_4 kiekis gali paskatinti Hsp baltymų, kurie dalyvauja netaisyklingai sulankstytų baltymų perlankstyme ir užkerta kelią baltymų agregacijai, raišką. Šis apsaugos mechanizmas gali sukelti transkripcijos sutrikimus, o tai lemtų *CUPI* promotoriaus

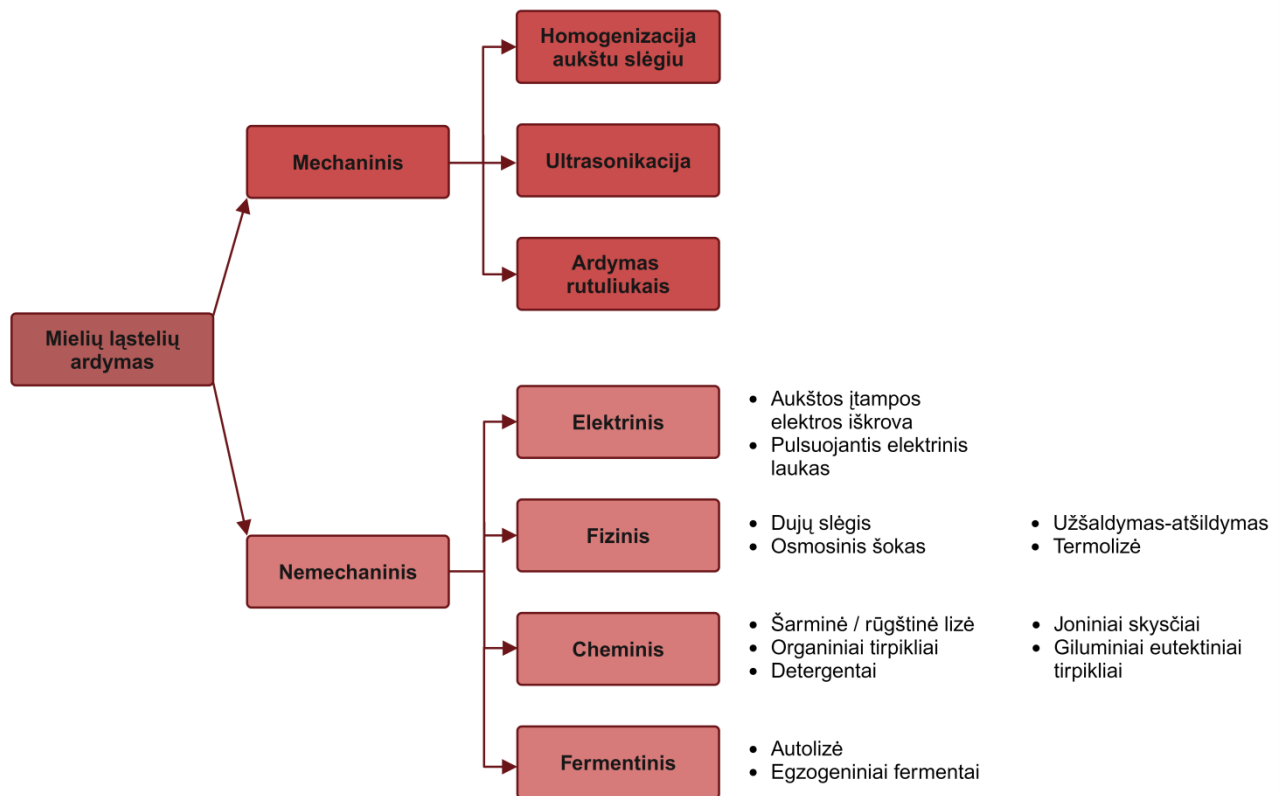
indukcijos efektyvumo sumažėjimą (Letek et al. 2022). Nėgana to, gali sutrikti įvairių signalų perdavimo keliai, variui jungiantis prie signalinių baltymų ir keičiant jų aktyvumą. Tai gali lemti kelių, kontroliuojančių *CUPI* promotoriaus indukciją, disreguliaciją, dėl to gali sumažėti arba netinkamai vykti tikslinių genų raiška (Ruta et al., 2016).

CUPI promotoriaus raišką taip pat gali sutrikdyti mutacijos promotoriaus regione. Mutacijos, pavyzdžiui, delecijos, vieno nukleotido pakaitos, galinčios pakeisti visą atvirą skaitymo rėmelį, gali sutrikdyti baltymo raišką, gali pakisti baltymo transliacijos lygis (padidėti arba sumažėti) (De Vooght et al., 2009), visa tai turėtų įtakos ir promotoriaus indukcijai. Mutacijos galėjo atsirasti transformuojant *E. coli* DH5 α ląsteles pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP plazmide, arba šiomis plazmidėmis transformuojant *S. cerevisiae* ląsteles. Norint įsitikinti, kad mutacijų neatsirado, reikėtų atlikti pilną abiejų plazmidžių sekoskaitą.

Kita vertus, *CUPI* promotoriaus indukcijos efektyvumą galėjo paveikti eksperimentinės sąlygos. Nors pH, purtymas ir temperatūra buvo palaikomi pastovūs, tačiau, imant mėginius visų ląstelės baltymų skyrimui, mėgintuvėliai su mielėmis ne kartą buvo išimami iš termostatinės purtyklės ir dedami atgal, jų besikeičianti pozicija purtyklėje galėjo trikdyti terpės su induktoriumi ir mielių maišymą. Tai galėjo lemti netolygų induktoriaus pasiskirstymą terpeje bei taip sumažinti indukcijos efektyvumą.

Antroji priežastis, dėl kurios tikslinio baltymo sintezė nevyko, galėtų būti nesėkmingas visų ląstelės baltymų skyrimas. NDS-PAGE nuotraukose matyti tik neryškios kitus ląstelės baltymus žyminčios juostelės, todėl yra tikimybė, kad mielių ląstelės galėjo lizuotis ne iki galo. Visų ląstelės baltymų skyrimas šarminės lizės metodu atliktas pagal Zhang et al., 2011. Atliekant eksperimentą iš naujo būtų galima ląsteles su LiOAc ir NaOH inkubuoti leduose ilgesnį laiką (vietoje 10 min., 15–20 min).

Be to, verta būtų pasirinkti kitą ląstelių ardymo metodą – mechaninį ar nemechaninį – nes šarminės lizės metodas galėjo būti neužtektinai jautrus, dėl mieles ir jų viduląstelinius baltymus, kartu ir tikslius baltymus, saugančios ląstelės sienelės (Alves et al., 2021). Svarbu paminėti, kad mechaniniai metodai nėra selektyvūs ir leidžia vienu metu atpalaiduoti daug įvairių ląstelės sienelės junginių, o tai apsunkina tolesnę metodo eigą, padidinant jos etapų skaičių. Nemechaniniai metodai (tarp jų ir šarminės lizės metodas), yra selektyvesni, pasižymi silpnesniu ardančiu poveikiu ląstelėms ir reikalauja mažiau energijos (Gauterio et al., 2023). Mielių ląstelių ardymo būdų įvairovė pateikta **4.1 pav.**



4.1 pav. Mechaniniai ir nemechaniniai mielių ląstelių ardymo būdai

Šaltinis: sudaryta darbo autorės, remiantis Gauterio et al., 2023, naudojantis internetine programa Biorender.

Taigi, šio tyrimo metu pirmą kartą buvo sukurtas mutantinis mielių baltymo Sup35 variantas K102R. Siekiant įvertinti Sup35K102RGFP ir Sup35GFP baltymų sintezę *S. cerevisiae*^{74-D694} [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse, ateityje reikia optimizuoti *CUP1* promotoriaus indukcijos ir visų ląstelės baltymų skyrimo metodus. Toliau, iš pRSCupSup35K102RGFP arba pRSCupSup35GFP plazmidę turinčių mielių ląstelių pašalinti natyvų Sup35 baltymą koduojantį geną, kad tarpusavyje lyginamų mielių kamienų baltymo sintezė vyktų kuo panašiau. Nepašalinus natyvaus *SUP35* geno, mielių ląstelėse gaminsis tiek genome koduojamas Sup35 baltymas, tiek plazmidėje koduojamas Sup35K102RGFP arba Sup35GFP baltymas. Kadangi būtų pagaminami didesni baltymo Sup35 kiekiai (sulieto su žaliai fluorescuojančiu baltymu (angl. *green fluorescent protein*, toliau GFP) ir nesulieto, tikėtina, kad dėl to galėtų formuotis didesni baltymų agregatai, ir į amiloidus jungtųsi tiek natyvus Sup35, tiek Sup35K102RGFP arba Sup35GFP, o tai lemtų netikslius rezultatus. Kadangi tikslinis baltymas yra sulietas su GFP, po natyvaus geno išmušimo (angl. *knock-out*) fluorescentinės mikroskopijos būdu, būtų galima palyginti pagaminamų Sup35K102RGFP ir Sup35GFP kiekius tarpusavyje, ir tokiu būdu įvertinti, ar įvesta mutacija yra reikšminga prionizacijos intensyvumui bei atsparumui proteosominei degradacijai.

IŠVADOS

1. Sup35 baltymo gene sėkmingai įvesta tikslinė K102R aminorūgšties pakaita, taikant persidengiančių fragmentų ilginimo PGR metodą.
2. *SUP35K102R* sėkmingai įliguotas į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt ir juo sėkmingai transformuotos *E. coli* DH5α kamieno ląstelės.
3. *SUP35K102R* sėkmingai įliguotas į „šaudyklinį“ mielių raiškos vektorių pRSCup ir juo sėkmingai transformuotos *E. coli* DH5α ir *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*][*PIN*⁺] kamienų ląstelės.
4. Natyvaus ir mutantinio Sup35 baltymo varianto K102R sintezė *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse nevyksta, yra neefektyvi arba nesėkmingai išskirti visi ląstelės baltymai sintezei įvertinti.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Ieva Jankauskaitė

Mielių baltymo Sup35 mutantinio varianto K102R kūrimas ir jo sintezė *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo sukurti mielių baltymo Sup35 mutantinį variantą K102R ir įvertinti jo sintezę *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse. Tam sukurti pradmenys ir vietai specifinės mutagenezės metodu ši pakaitą įvesta per tris nepriklausomas PGR reakcijas. I ir II reakcijų produktai – AB (332 bp) ir CD (2521 bp), III – šie du fragmentai, sujungti į vieną AD (*SUP35K102RGFP*) (2827 bp). Toliau, *SUP35K102RGFP* įterptas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių ir sėkmingai pagausintas *Escherichia coli* DH5α ląstelėse. Tuomet mutuotas genas sėkmingai įterptas į mielių raiškos vektorių pRSCup ir pagausintas *E. coli* DH5α ląstelėse ir *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse. *SUP35K102RGFP* patikrintas sekoskaitos metodu po kiekvieno darbo etapo. Atlikta sekos analizė naudojant Benchling internetinę programą parodė, kad sukurti mielių *SUP35* geno mutantinį variantą K102R pavyko. Tada vykdyta Sup35K102RGFP ir Sup35GFP baltymų sintezės indukcija vario jonais *S. cerevisiae* ląstelėse, šarminės lizės metodu išskirti visi mielių ląstelių baltymai ir atlikta jų analizė poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu (NDS-PAGE). Sup35K102RGFP ir baltymo Sup35GFP sintezė *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] kamieno ląstelėse neįvertinta dėl neefektyvios *CUP1* promotoriaus indukcijos ir / arba nesėkmingo visų ląstelės baltymų skyrimo arba pasirinktas nepakankamai jautrus visų ląstelės baltymų skyrimo šarminės lizės metodas.

Ieva Jankauskaitė

**Creation of Mutant Variant K102R of Yeast Protein Sup35 and Its Expression in
Saccharomyces cerevisiae Cells**

Master thesis

SUMMARY

The goal of this work was to create yeast protein Sup35 mutant variant K102R and to estimate its synthesis in cells of *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺]. In order to achieve this, primers were created and site-directed mutagenesis was used to change one nucleotide in the sequence through three independent PCR reactions. Ist and IInd reaction products were AB (332 bp) and CD (2521 bp), IIIrd reaction product – those two fragments fused into one AD fragment (*SUP35K102RGFP*) (2827 bp). Later this fragment was inserted into pJET1.2/blunt cloning vector and successfully multiplied in *Escherichia coli* DH5α cells. After that mutated gene was inserted into yeast shuttle vector pRSCup and multiplied in *E. coli* DH5α cells and in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *SUP35K102RGFP* was sequenced after every step of the research and analyzed using Benchling online application which showed that creation of yeast gene *SUP35* mutant variant K102R was achieved. Then, Sup35K102RGFP and Sup35GFP protein synthesis was induced by copper ions in the *S. cerevisiae* cells, all yeast cell proteins were purified by alkaline lysis and their analysis was performed in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Synthesis of Sup35K102RGFP and Sup35GFP in the *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] strain was not evaluated due to inefficient induction of the *CUP1* promoter and/or incomplete purification of all the proteins of the cell or alkaline lysis was not enough sensitive method in this research.

ASMENINIO INDĒLIO APRAŠYMAS

Mutacijos pasirinkimas atliktas savarankiškai, po literatūros analizės. Darbo planą padėjo sukurti darbo vadovė Justina Versockienė. Darbo metodika ir rezultatų analizė atlikta savarankiškai, taip pat konsultuojantis su darbo vadove.

PADĖKA

Padėka išreiškiama darbo vadovei Justinai Versockienei už pagalbą susidarant darbo planą, konsultacijas ir mokslinį šio darbo redagavimą. Taip pat, dėkoju kolegai, studentui Airidui Rudžianskui už padovanotus pradmenis, kurie buvo naudojami darbe. Dėkoju dr. Yury Chernof už padovanotą darbe naudotą mielių kamieną.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Addgene.org [internetinė svetainė]. Sukurta 2004-01 [Cituota 2024-05-25]. Adresas: <https://www.addgene.org/1087/>
2. Adhikari, A., & Chen, Z. J. (2009). Diversity of polyubiquitin chains. *Developmental Cell*, *16*(4), 485–486. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.001>
3. 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>
4. Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., & Lindquist, S. (2009). A Systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell*, *137*(1), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.044>
5. Allen, K. D., Chernova, T. A., Tennant, E. P., Wilkinson, K. D., & Chernoff, Y. O. (2007). Effects of ubiquitin system alterations on the formation and loss of a yeast prion. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(5), 3004–3013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609597200>
6. Alves, E. M., de Souza, J. F., & de Oliva Neto, P. (2021). Advances in yeast autolysis technology - a faster and safer new bioprocess. *Brazilian Journal of Food Technology*, *25*, 1–14. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.24920>
7. Amerik, A. Y., & Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1695*(1–3), 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.10.003>
8. Anh-Hue T. Tu. (2008). Transformation of *Escherichia coli* Made Competent by Calcium Chloride Protocol. *08/09/08*, *5*, 1.
9. Badi, L., & Barberis, A. (2002). The *CUPI* upstream repeated element renders *CUPI* promoter activation insensitive to mutations in the RNA polymerase II transcription complex. *Nucleic Acids Research*, *30*(6), 1306–1315. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1306>
10. Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*, *529*, 299–309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
11. Bertram, G., Bell, H. A., Ritchie, D. W., Fullerton, G., & Stansfield, I. (2000). Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *Rna*, *6*(9), 1236–1247. <https://doi.org/10.1017/S1355838200000777>
12. Borchsenius, A. S., Wegrzyn, R. D., Newnam, G. P., Inge-Vechtomov, S. G., & Chernoff, Y. O. (2001). Yeast prion protein derivative defective in aggregate shearing and production of new “seeds.” *EMBO Journal*, *20*(23), 6683–6691. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6683>
13. Brown, J. C. S., & Lindquist, S. (2009). A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes and Development*, *23*(19), 2320–2332. <https://doi.org/10.1101/gad.1839109>
14. Carrigan, P. E., Ballar, P., and Tuzmen, S. (2010). Site-Directed Mutagenesis. *Disease Gene Identification. Methods in Molecular Biology* (Vol. 700, pp. 107–124). <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3>
15. Cascarina, S. M., Paul, K. R., Machihara, S., & Ross, E. D. (2018). Sequence features governing aggregation or degradation of prion-like proteins. *PLoS Genetics*, *14*(7), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007517>
16. Castorena-Torres, F., Katia Peñuelas-Urquides, & León, M. B. de. (2016). Site-directed mutagenesis by polymerase chain reaction. In *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications* (p. 164).
17. Chakravarty, A. K., Smejkal, T., Itakura, A., Garcia, D. M., & Daniel, F. (2021). A non-amyloid prion particle that activates a heritable gene expression program. *77*(2), 251–265. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.028.A>
18. Chan, P. H. W., Lee, L., Kim, E., Hui, T., Stoynov, N., Nassar, R., Moksa, M., Cameron, D. M., Hirst, M., Gsponer, J., & Mayor, T. (2017). The [*PSI*⁺] yeast prion does not wildly affect proteome composition whereas selective pressure exerted on [*PSI*⁺] cells can promote

- aneuploidy. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07999-8>
19. Chang, H. Y., Lin, J. Y., Lee, H. C., Wang, H. L., & King, C. Y. (2008). Strain-specific sequences required for yeast [*PSI*⁺] prion propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13345–13350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802215105>
 20. Chen, B., Newnam, G. P., & Chernoff, Y. O. (2007). Prion species barrier between the closely related yeast proteins is detected despite coaggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2791–2796. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611158104>
 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, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 80(3–4), 297–300. <https://doi.org/10.1023/A:1013040812987>
 22. Chernoff, Y. O., Ptyushkina, M. V., Samsonova, M. G., Sizonencko, G. I., Pavlov, Y. I., Ter-Avanesyan, M. D., & Inge-Vechtomov, S. G. (1992). Conservative system for dosage-dependent modulation of translational fidelity in eukaryotes. *Biochimie*, 74(5), 455–461. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90086-T](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90086-T)
 23. Chernoff, Yury O. (2004). Amyloidogenic domains, prions and structural inheritance: Rudiments of early life or recent acquisition? *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(6), 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.09.002>
 24. Chernoff, Yury O., Derkach, I. L., & Inge-Vechtomov, S. G. (1993). Multicopy *SUP35* gene induces *de novo* appearance of *psi*-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 24(3), 268–270. <https://doi.org/10.1007/BF00351802>
 25. Chernoff, Yury O., Galkin, A. P., Lewitin, E., Chernova, T. A., Newnam, G. P., & Belenkiy, S. M. (2000). Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein. *Molecular Microbiology*, 35(4), 865–876. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01761.x>
 26. Chernoff, Yury O., Lindquist, S. L., Ono, B. I., Inge-Vechtomov, S. G., & Liebman, S. W. (1995). Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*PSI*⁺]. *Science*, 268(5212), 880–884. <https://doi.org/10.1126/science.7754373>
 27. Chernova, T. A., Allen, K. D., Wesoloski, L. M., Shanks, J. R., Chernoff, Y. O., & Wilkinson, K. D. (2003). Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52102–52115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310283200>
 28. Chernova, T. A., Romanyuk, A. V., Karpova, T. S., Shanks, J. R., Ali, M., Moffatt, N., Howie, R. L., O'Dell, A., McNally, J. G., Liebman, S. W., Chernoff, Y. O., & Wilkinson, K. D. (2011). Prion induction by the short-lived, stress-induced protein Lsb2 is regulated by ubiquitination and association with the actin cytoskeleton. *Molecular Cell*, 43(2), 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.001>
 29. 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>
 30. 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>
 31. Clarke, A. R., Jackson, G. S., Collinge, J., Pepys, M. B., Barron, L. D., Masel, J., Tahari-Alaoui, A., Lansbury, P., Dobson, C. M., Exley, C., & Feizi, T. (2001). The molecular biology of prion propagation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1406), 185–195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0764>
 32. Colby, D. W., & Prusiner, S. B. (2011). Prions. 1–23.
 33. Conde, J., & Fink, G. R. (1976). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10), 3651–3655. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3651>

34. Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M., & Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence $[PSI^+]$ propagation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), 3301–3315. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.10.3301-3315.2002>
35. Cox B. (1993). The early days of yeast genetics. M.N. Hall, E. Linder (Eds.), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 219-239.
36. De Vooght, K. M. K., Wijk, R. Van, & Van Solinge, W. W. (2009). Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 698–708. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.120931>
37. Dergalev, A. A., Alexandrov, A. I., Ivannikov, R. I., Ter-Avanesyan, M. D., & Kushnirov, V. V. (2019). Yeast Sup35 prion structure: two types, four parts, many variants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112633>
38. Dergalev, A. A., Urakov, V. N., Agaphonov, M. O., Alexandrov, A. I., & Kushnirov, V. V. (2021). Dangerous stops: nonsense mutations can dramatically increase frequency of prion conversion. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms22041542>
39. Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y., & Liebman, S. W. (2001b). Prions affect the appearance of other prions: the story of $[PIN^+]$. *Cell*, 106(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00427-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00427-5)
40. 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? *EMBO Journal*, 19(9), 1942–1952. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.9.1942>
41. 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>
42. Derkatch, I. L., & Liebman, S. W. (2007). Prion-prion interactions. *Protein-Based Inheritance*, September, 39–55. <https://doi.org/10.1201/9781498712507-10>
43. Derkatch, I. L., Uptain, S. M., Outeiro, T. F., Krishnan, R., Lindquist, S. L., & Liebman, S. W. (2004). Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the *de novo* formation of the $[PSI^+]$ prion in yeast and aggregation of Sup35 *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 12934–12939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404968101>
44. Dever, T. E., Kinzy, T. G., & Pavitt, G. D. (2016). Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203(1), 65–107. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.186221>
45. Doronina, V. A., Staniforth, G. L., Speldewinde, S. H., Tuite, M. F., & Grant, C. M. (2015). Oxidative stress conditions increase the frequency of *de novo* formation of the yeast $[PSI^+]$ prion. *Molecular Microbiology*, 96(1), 163–174. <https://doi.org/10.1111/mmi.12930>
46. Dotto, G. P., Horiuchi, K., & Zinder, N. D. (1984). The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains. *Journal of Molecular Biology*, 172(4), 507–521. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(84\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(84)80020-0)
47. Falsone, A., & Falsone, S. F. (2015). Legal but lethal: Functional protein aggregation at the verge of toxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00045>
48. Ferreira, P. C., Ness, F., Edwards, S. R., Cox, B. S., & Tuite, M. F. (2001). The elimination of the yeast $[PSI^+]$ prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Molecular Microbiology*, 40(6), 1357–1369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02478.x>
49. Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 477–513. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>

50. Finley, D., Özkaynak, E., & Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, *48*(6), 1035–1046. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90711-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90711-2)
51. Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T., & Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *192*(2), 319–360. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140467>
52. Ford, T. (2015). Restriction cloning. In *Addgene's eBook Collection. Plasmids 101*, August, 83–89.
53. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid - from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(5), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>
54. Francisco Bolivar and Keith Backman. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods in Enzymology* (68), 245-267. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01275-4>
55. Fu, Q.-S., Song, A.-X., & Hu, H.-Y. (2012). Structural aspects of ubiquitin binding specificities. *Current Protein & Peptide Science*, *13*(5), 482–489. <https://doi.org/10.2174/138920312802430581>
56. Ganusova, E. E., Ozolins, L. N., Bhagat, S., Newnam, G. P., Wegrzyn, R. D., Sherman, M. Y., & Chernoff, Y. O. (2006). Modulation of prion formation, aggregation, and toxicity by the actin cytoskeleton in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(2), 617–629. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.2.617-629.2006>
57. Gautério, G. V., Maciel, R., Karraz, F. C., Alice, M., Coelho, Z., Ribeiro, B. D., & Lemes, A. C. (2023). Cell disruption and permeabilization methods for obtaining yeast bioproducts. (6). <https://doi.org/10.1016/j.clce.2023.100112>
58. Ghosh, R., Dong, J., Wall, J., & Frederick, K. K. (2018). Amyloid fibrils embodying distinctive yeast prion phenotypes exhibit diverse morphologies. *FEMS Yeast Research*, *18*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy059>
59. Glover, J., & Lum, R. (2009). Remodeling of protein aggregates by Hsp104. *Protein & Peptide Letters*, *16*(6), 587–597. <https://doi.org/10.2174/092986609788490087>
60. 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*, *89*(5), 811–819. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80264-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80264-0)
61. Goedert, M., Masuda-Suzukake, M., & Falcon, B. (2017). Like prions: the propagation of aggregated tau and α -synuclein in neurodegeneration. *Brain*, *140*(2), 266–278. <https://doi.org/10.1093/brain/aww230>
62. Goncharoff, D. K., Du, Z., & Li, L. (2018). A brief overview of the Swi1 prion—[SWI⁺]. *FEMS Yeast Research*, *18*(6), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy061>
63. Gorkovskiy, A., Thurber, K. R., Tycko, R., & Wickner, R. B. (2014). Locating folds of the in-register parallel β -sheet of the Sup35p prion domain infectious amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(43), E4615–E4622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417974111>
64. Greene, L. E., Saba, F., Silberman, R. E., & Zhao, X. (2020). Mechanisms for curing yeast prions. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21186536>
65. Halfmann, R., Jarosz, D. F., Jones, S. K., Chang, A., Lancaster, A. K., & Lindquist, S. (2012). Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature*, *482*(7385), 363–368. <https://doi.org/10.1038/nature10875>
66. Halfmann, R., Wright, J. R., Alberti, S., Lindquist, S., & Rexach, M. (2012). Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin. *Prion*, *6*(4), 391–399. <https://doi.org/10.4161/pri.20199>
67. Helsen, C. W., & Glover, J. R. (2012). Insight into molecular basis of curing of [PSI⁺] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104). *Journal of Biological Chemistry*, *287*(1), 542–556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302869>

68. Hipp, M. S., Park, S. H., & Hartl, U. U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology*, 24(9), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.05.003>
69. Holmes, D. L., Lancaster, A. K., Lindquist, S., & Halfmann, R. (2013). Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion. *Cell*, 153(1), 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.026>
70. Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., & Katada, T. (1999). The Eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. *Biochemistry*, 274(24), 16677–16680.
71. Hosoda, N., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., Kikuchi, Y., Hoshino, S., & Katada, T. (2003). Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38287–38291. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300300200>
72. Huang, Y. W., Chang, Y. C., Diaz-Avalos, R., & King, C. Y. (2015). W8, a new Sup35 prion strain, transmits distinctive information with a conserved assembly scheme. *Prion*, 9(3), 207–227. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1039217>
73. Husnjak, K., & Dikic, I. (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 291–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051810-094654>
74. Inge-Vechtomov, S. G., Zhouravleva, G. A., & Chernoff, Y. O. (2007). Biological roles of prion domains. *Prion*, 1(4), 228–235. <https://doi.org/10.4161/pri.1.4.5059>
75. Inge-Vechtomov, S., Zhouravleva, G., & Philippe, M. (2003). Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biology of the Cell*, 95(3–4), 195–209. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00035-2)
76. Ishikawa, T. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* in neuroscience: How unicellular organism helps to better understand prion protein? *Neural Regeneration Research*, 16(3), 489–495. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.293137>
77. Itakura, A. K., Chakravarty, A. K., Jakobson, C. M., & Jarosz, D. F. (2020). Widespread prion-based control of growth and differentiation strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 77(2), 266–278.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.027>
78. Ivanov, A., Mikhailova, T., Eliseev, B., Yeramala, L., Sokolova, E., Susorov, D., Shuvalov, A., Schaffitzel, C., & Alkalaeva, E. (2016). PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7766–7776. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw635>
79. Jensen, M. A., True, H. L., Chernoff, Y. O., & Lindquist, S. (2001). Molecular population genetics and evolution of a prion-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159(2), 527–535. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.527>
80. Juenemann, K., Schipper-Krom, S., Wiemhoefer, A., Kloss, A., Sanz, A. S., & Reits, E. A. J. (2013). Expanded polyglutamine-containing N-terminal huntingtin fragments are entirely degraded by mammalian proteasomes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27068–27084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486076>
81. Jung, G., Jones, G., & Masison, D. C. (2002). Amino acid residue 184 of yeast Hsp104 chaperone is critical for prion-curing by guanidine, prion propagation, and thermotolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9936–9941. <https://doi.org/10.1073/pnas.152333299>
82. Kajava, A. V., Baxa, U., Wickner, R. B., & Steven, A. C. (2004). A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated β -structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 7885–7890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402427101>
83. Keefer, K. M., Stein, K. C., & True, H. L. (2017). Heterologous prion-forming proteins interact to cross-seed aggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05829-5>

84. Kochneva-Pervukhova, N. V., Poznyakovski, A. I., Smirnov, V. N., & Ter-Avanesyan, M. D. (1998). C-terminal truncation of the Sup35 protein increases the frequency of *de novo* generation of a prion-based $[PSI^+]$ determinant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, *34*(2), 146–151. <https://doi.org/10.1007/s002940050379>
85. Kochneva-Pervukhova, Natalia V., Chechenova, M. B., Valouev, I. A., Kushnirov, V. V., Smirnov, V. N., & Ter-Avanesyan, M. D. (2001). $[PSI^+]$ prion generation in yeast: Characterization of the “strain” difference. *Yeast*, *18*(6), 489–497. <https://doi.org/10.1002/yea.700>
86. Kushnirov, Vitaliy V., Ter-Avanesyan, M. D., Telckov, M. V., Surguchov, A. P., Smirnov, V. N., & Inge-Vechtomov, S. G. (1988). Nucleotide sequence of the *SUP₂* (*SUP35*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *66*(1), 45–54. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90223-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90223-5)
87. Kushnirov, Vitaly V., & Ter-Avanesyan, M. D. (1998). Structure and replication of yeast prions. *Cell*, *94*(1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81216-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81216-7)
88. Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(March), 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>
89. Lawson, C. L., Swigon, D., Murakami, K. S., Darst, S. A., Helen, M., & Ebright, R. H. (2004). CAP: DNA binding and activation. *October*, *14*(1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.01.012>
90. Liebman, S. W., & Chernoff, Y. O. (2012). Prions in yeast. *Genetics*, *191*(4), 1041–1072. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137760>
91. Liu, J. J., Sondheimer, N., & Lindquist, S. L. (2002). Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion $[PSI^+]$. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(SUPPL. 4), 16446–16453. <https://doi.org/10.1073/pnas.252652099>
92. Liu, Jia-jia, & Lindquist, S. (1999). Oligopeptide-repeat expansions modulate. *Nature*, *400*(August), 573–576.
93. Liu, Jian, 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>
94. Liu, Y., Wei, H., Wang, J., Qu, J., Zhao, W., & Tao, H. (2007). Effects of randomizing the Sup35NM prion domain sequence on formation of amyloid fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *353*(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.143>
95. Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O’Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*(6109), 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
96. Lyke, D. R., Dorweiler, J. E., & Manogaran, A. L. (2019). The three faces of Sup35. *Yeast*, *36*(8), 465–472. <https://doi.org/10.1002/yea.3392>
97. MacLea, K. S., Paul, K. R., Ben-Musa, Z., Waechter, A., Shattuck, J. E., Gruca, M., & Ross, E. D. (2015). Distinct amino acid compositional requirements for formation and maintenance of the $[PSI^+]$ prion in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(5), 899–911. <https://doi.org/10.1128/mcb.01020-14>
98. Manogaran, A. L., Hong, J. Y., Hufana, J., Tyedmers, J., Lindquist, S., & Liebman, S. W. (2011). Prion formation and polyglutamine aggregation are controlled by two classes of genes. *PLoS Genetics*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001386>
99. Maqani, N., Fine, R. D., Shahid, M., Li, M., Enriquez-Hesles, E., & Smith, J. S. (2018). Spontaneous mutations in *CYC8* and *MIG1* suppress the short chronological lifespan of budding yeast lacking *SNF1/AMPK*. *Microbial Cell*, *5*(5), 233–248. <https://doi.org/10.15698/mic2018.05.630>

100. Masison, D. C., & Reidy, M. (2015). Yeast prions are useful for studying protein chaperones and protein quality control. *Prion*, 9(3), 174–183. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1027856>
101. Matlock, B. (2015). Assessment of nucleic acid purity. *Thermoscientific Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*, 1–2. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
102. Matthew J. Betts and Robert B. Russell. (2007). Amino-Acid properties and consequences of substitutions. In *Bioinformatics* (Vol. 9).
103. Mattoo, R. U. H., Sharma, S. K., Priya, S., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2013). Hsp110 is a *bona fide* chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21399–21411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479253>
104. McDowell, G. S., & Philpott, A. (2013). Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(8), 1833–1842. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.026>
105. McKinley, M. P., Bolton, D. C., & Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the Scrapie prion. *Cell*, 35(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90207-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90207-6)
106. Michal Letek, Luis M. Mateos, V. B. and J. N. (2022). Involvement of the high-osmolarity glycerol pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in protection against copper toxicity. *Antioxidants*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020200>
107. Morgan, K. (2014). Origin of replication. In *Addgene's eBook Collection. Plasmids 101*, February, 14-16.
108. Mukhopadhyay, S., Krishnan, R., Lemke, E. A., Lindquist, S., & Deniz, A. A. (2007). A natively unfolded yeast prion monomer adopts an ensemble of collapsed and rapidly fluctuating structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2649–2654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611503104>
109. Nakayashiki, T., Kurtzman, C. P., Edskes, H. K., & Wickner, R. B. (2005). Yeast prions [URE3] and [PSI⁺] are diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10575–10580. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504882102>
110. Nath, S. R., & Lieberman, A. P. (2017). The ubiquitination, disaggregation and proteasomal degradation machineries in polyglutamine disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00078>
111. Ness, F., Ferreira, P., Cox, B. S., & Tuite, M. F. (2002). Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion “seeds” but not prion protein aggregation in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5593–5605. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.15.5593-5605.2002>
112. Nguyen, P., Oumata, N., Soubigou, F., Evrard, J., Desban, N., Lemoine, P., Bouaziz, S., Blondel, M., & Voisset, C. (2014). Evaluation of the antiprion activity of 6-aminophenanthridines and related heterocycles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.083>
113. Nicolas, G., & Veltman, J. A. (2019). The role of *de novo* mutations in adult-onset neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathologica*, 137(2), 183–207. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1939-3>
114. Nijman, S. M. B., Luna-Vargas, M. P. A., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M. G., Sixma, T. K., & Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 123(5), 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007>
115. Nizhnikov, A. A., Antonets, K. S., Inge-Vechtomov, S. G., & Derkach, I. L. (2014). Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*: turning nonsense into sense. *Prion*, 8(3), 247–260. <https://doi.org/10.4161/pri.29851>
116. Okamoto, A., Hosoda, N., Tanaka, A., Newnam, G. P., Chernoff, Y. O., & Hoshino, S. I. (2017). Proteolysis suppresses spontaneous prion generation in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 292(49), 20113–20124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811323>

117. 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>
118. Osherovich, L. Z., & Weissman, J. S. (2001). Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [*PSI*⁺] prion. *Cell*, 106(2), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00440-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00440-8)
119. Panasenko, O. O. (2014). Identification of ubiquitinated proteins. *Materials and Methods*, 4(May 2014), 1-20. <https://doi.org/10.13070/mm.en.4.827>
120. Park, C. W., & Ryu, K. Y. (2014). Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis. *BMB Reports*, 47(9), 475–482. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.9.128>
121. Park, Y. N., Morales, D., Rubinson, E. H., Masison, D., Eisenberg, E., & Greene, L. E. (2012). Differences in the curing of [*PSI*⁺] prion by various methods of Hsp104 inactivation. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037692>
122. Patel, B. K., Gavin-Smyth, J., & Liebman, S. W. (2009). The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nature Cell Biology*, 11(3), 344–349. <https://doi.org/10.1038/ncb1843>
123. Patrick, M. (2014). Yeast vectors. In *Addgene's eBook Collection. Plasmids 101*, February, 121-124.
124. Peña, 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*, 18(5), 2514–2523. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.5.2514>
125. Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., & Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology*, 21(8), 921–926. <https://doi.org/10.1038/nbt849>
126. Pezza, J. A., Villali, J., Sindi, S. S., & Serio, T. R. (2014). Amyloid-associated activity contributes to the severity and toxicity of a prion phenotype. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5384>
127. Ponomarenko, M., Stepanenko, I., & Kolchanov, N. (2013). Heat shock proteins. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00685-9>
128. Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
129. Prusiner, S. B. (2012). A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science*, 336(6088), 1511–1513. <https://doi.org/10.1126/science.1222951>
130. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., & Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35(2 PART 1), 349–358. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90168-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90168-X)
131. Reidy, M., & Masison, D. C. (2011). Modulation and elimination of yeast prions by protein chaperones and co-chaperones. *Prion*, 5(4), 245–249. <https://doi.org/10.4161/pri.17749>
132. Reidy, M., Miot, M., & Masison, D. C. (2012). Prokaryotic chaperones support yeast prions and thermotolerance and define disaggregation machinery interactions. *Genetics*, 192(1), 185–193. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.142307>
133. Resende, C. G., Outeiro, T. F., Sands, L., Lindquist, S., & Tuite, M. F. (2003). Prion protein gene polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 49(4), 1005–1017. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03608.x>
134. Reyes-Turcu, F. E., & Wilkinson, K. D. (2009). Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chemical Reviews*, 109(4), 1495–1508. <https://doi.org/10.1021/cr800470j>
135. Rikhvanov, E. G., Romanova, N. V., & Chernoff, Y. O. (2007). Chaperone effects on prion and nonprion aggregates. *Prion*, 1(4), 217–222. <https://doi.org/10.4161/pri.1.4.5058>
136. Rogoza, T., Goginashvili, A., Rodionova, S., Ivanov, M., Viktorovskaya, O., Rubel, A., Volkov, K., & Mironova, L. (2010). Non-Mendelian determinant [*ISP*⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10573–10577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005949107>
137. Roque, S., Cerciati, M., Gaugué, S., Mora, L., Floch, A. G., De Zamaroczy, M., Heurgué-Hamard, V., & Kervestin, S. (2015). Interaction between the poly(A)-binding protein Pab1 and the eukaryotic release factor eRF3 regulates translation termination but not mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*, 21(1), 124–134. <https://doi.org/10.1261/rna.047282.114>
 138. Ross, E. D., Baxa, U., & Wickner, R. B. (2004). Scrambled prion domains form prions and amyloid. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7206–7213. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7206-7213.2004>
 139. Ross, E. D., Edskes, H. K., Terry, M. J., & Wickner, R. B. (2005). Primary sequence independence for prion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12825–12830. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506136102>
 140. Ross, E. D., Minton, A., & Wickner, R. B. (2005). Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1039–1044. <https://doi.org/10.1038/ncb1105-1039>
 141. Ruta, L. L., & Farcasanu, I. C. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* concentrates subtoxic copper onto cell wall from solid media containing reducing sugars as carbon source. *Bioengineering*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering8030036>
 142. Ruta, L. L., Popa, C. V., Nicolau, I., & Farcasanu, I. C. (2016). Calcium signaling and copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24514–24526. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6666-5>
 143. Rutherford, J. C., & Bird, A. J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic Cell*, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1128/EC.3.1.1-13.2004>
 144. Salas-Marco, J., & Bedwell, D. M. (2004). GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7769–7778. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7769-7778.2004>
 145. Sap, K. A., & Reits, E. A. (2020). Strategies to investigate ubiquitination in Huntington’s Disease. *Frontiers in Chemistry*, 8(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00485>
 146. Schipper-Krom, S., Juenemann, K., & Reits, E. A. J. (2012). The ubiquitin-proteasome system in Huntington’s disease: are proteasomes impaired, initiators of disease, or coming to the rescue? *Biochemistry Research International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/837015>
 147. Sharma, J., & Liebman, S. W. (2013). Exploring the basis of [PIN⁺] variant differences in [PSI⁺] induction. *Journal of Molecular Biology*, 425(17), 3046–3059. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.06.006>
 148. Shewmaker, F., Wickner, R. B., & Tycko, R. (2006). Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel β -sheet structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19754–19759. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609638103>
 149. Shorter, J. (2011). The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026319>
 150. Silva, J. L., & Cordeiro, Y. (2016). The “Jekyll and Hyde” actions of nucleic acids on the prion-like aggregation of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 291(30), 15482–15490. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.733428>
 151. Snapgene.com [internetinè svetainè]. Sukurta 2004-01 [Cituota 2024-05-25]. Adresas: https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/pJET1.2_blunt
 152. Sondheimer, N., & Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Molecular Cell*, 5(1), 163–172. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80412-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80412-8)
 153. Song, H., Mugnier, P., Das, A. K., Webb, H. M., Evans, D. R., Tuite, M. F., Hemmings, B. A., & Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 - mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell*, 100(3), 311–321. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80667-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80667-4)

154. Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2009). Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*, *138*(2), 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.042>
155. Speldewinde, S. H., Doronina, V. A., & Grant, C. M. (2015). Autophagy protects against *de novo* formation of the [PSI⁺] prion in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(25), 4541–4551. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0548>
156. Sporn, Z. A., & Hines, J. K. (2015). Hsp40 function in yeast prion propagation: amyloid diversity necessitates chaperone functional complexity. *Prion*, *9*(2), 80–89. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1020268>
157. Stansfield, I., Jones, K. M., Kushnirov, V. V., Dagkesamanskaya, A. R., Poznyakovski, A. I., Paushkin, S. V., Nierras, C. R., Cox, B. S., Ter-Avanesyan, M. D., & Tuite, M. F. (1995). The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, *14*(17), 4365–4373. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00111.x>
158. Stansfield, I., Kushnirov, V. V., Jones, K. M., & Tuite, M. F. (1997). A conditional-lethal translation termination defect in a *sup45* mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, *245*(3), 557–563. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00557.x>
159. Taneja, V., Maddelein, M. L., Talarek, N., Saupe, S. J., & Liebman, S. W. (2007). A non-Q/N-Rich prion domain of a foreign prion, [Het-s], can propagate as a prion in yeast. *Molecular Cell*, *27*(1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.027>
160. 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>
161. Thiele, D. J. (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Molecular and Cellular Biology*, *8*(7), 2745–2752. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.7.2745-2752.1988>
162. Toombs, J. A., Liss, N. M., Cobble, K. R., Ben-Musa, Z., & Ross, E. D. (2011). [PSI⁺] maintenance is dependent on the composition, not primary sequence, of the oligopeptide repeat domain. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021953>
163. Toombs, J. A., McCarty, B. R., & Ross, E. D. (2010). Compositional determinants of prion formation in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(1), 319–332. <https://doi.org/10.1128/mcb.01140-09>
164. Tsvetkov, A. S., Arrasate, M., Barmada, S., Ando, D. M., Sharma, P., Shaby, B. A., & Finkbeiner, S. (2013). Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nature Chemical Biology*, *9*(9), 586–594. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1308>
165. Tuite, M. F. (2000). Yeast prions and their prion-forming domain. *Cell*, *100*(3), 289–292. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80663-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80663-7)
166. Tyedmers, J., Madariaga, M. L., & Lindquist, S. (2008). Prion switching in response to environmental stress. *PLoS Biology*, *6*(11), 2605–2613. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060294>
167. Uniprot [duomenų bazė internete] (a). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05453/entry>
168. Uniprot [duomenų bazė internete] (b). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54785/entry>
169. Uniprot [duomenų bazė internete] (c). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P23202/entry>
170. Uniprot [duomenų bazė internete] (d). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09547/entry>

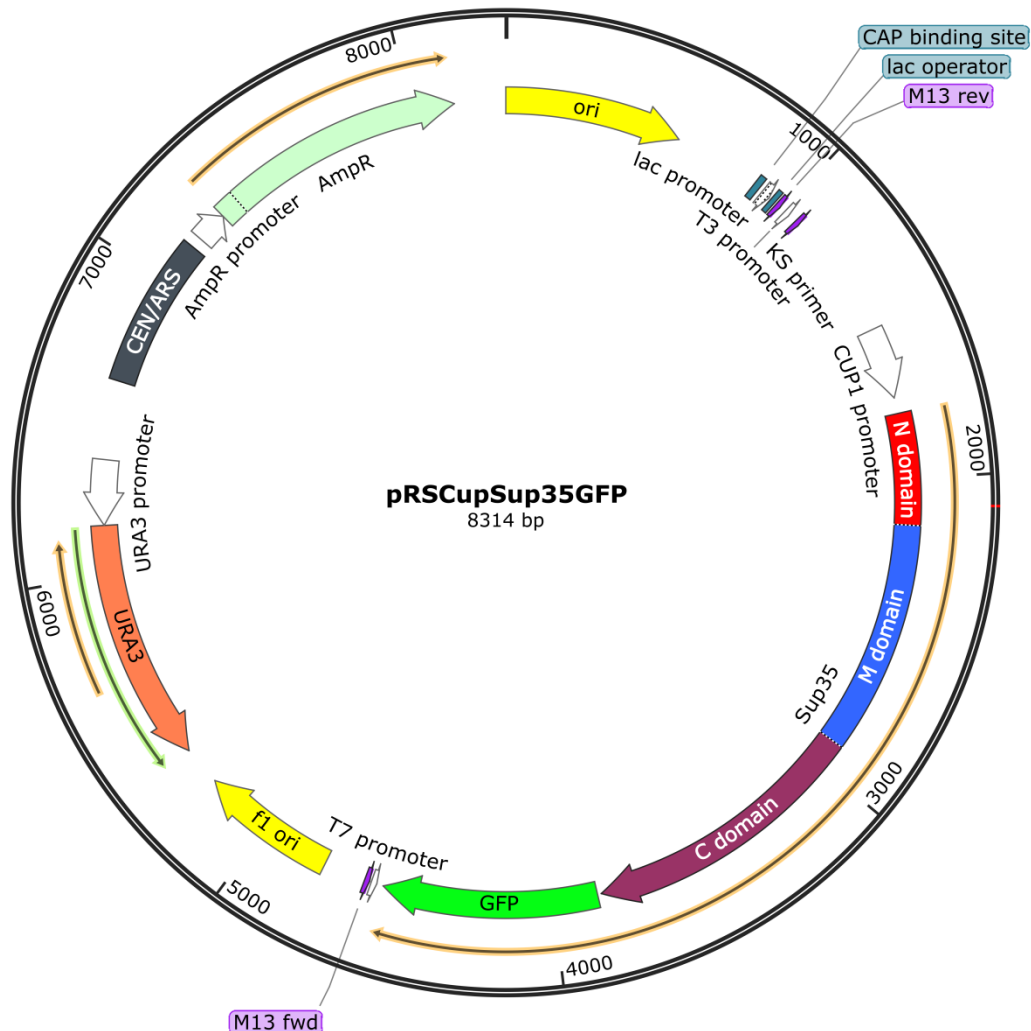
171. Uniprot [duomenų bazė internete] (e). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q08972/entry>
172. Uniprot [duomenų bazė internete] (f). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P25367/entry>
173. Uniprot [duomenų bazė internete] (g). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P14922/entry>
174. Uniprot [duomenų bazė internete] (h). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P32432/entry>
175. Uniprot [duomenų bazė internete] (i). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P07884/entry>
176. Uniprot [duomenų bazė internete] (j). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q06449/entry>
177. Uniprot [duomenų bazė internete] (k). Stanford (JAV): Stanford University. Sukurta 2003-12. Cituota [2024-04-27]. Adresas: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03962/entry>
178. University of Massachusetts Amherst. (2020). Unraveling one of prion disease's deadly secrets. *ScienceDaily*. Cituota [2024-05-25]. Adresas: www.sciencedaily.com/releases/2020/05/2005
179. Vishveshwara, N., & Liebman, S. W. (2009). Heterologous cross-seeding mimics cross-species prion conversion in a yeast model. *BMC Biology*, 7, 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-26>
180. Vitrenko, Y. A., Gracheva, E. O., Richmond, J. E., & Liebman, S. W. (2007). Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1779–1787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609269200>
181. Wada, M., & Ito, K. (2014). A genetic approach for analyzing the co-operative function of the tRNA mimicry complex, eRF1/eRF3, in translation termination on the ribosome. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7851–7866. <https://doi.org/10.1093/nar/gku493>
182. Walsh, C. K., & Sadanandom, A. (2014). Ubiquitin chain topology in plant cell signaling: a new facet to an evergreen story. *Frontiers in Plant Science*, 5(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00122>
183. Wang, M., Wang, D., Yu, J., & Huang, S. (2020). Enrichment in conservative amino acid changes among fixed and standing missense variations in slowly evolving proteins. *PeerJ*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.9983>
184. Wegrzyn, R. D., Bapat, K., Newnam, G. P., Zink, A. D., & Chernoff, Y. O. (2001). Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), 4656–4669. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.14.4656-4669.2001>
185. Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 264(5158), 566–569. <https://doi.org/10.1126/science.7909170>
186. 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>
187. Winkler, J., Tyedmers, J., Bukau, B., & Mogk, A. (2012). Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. *Journal of Structural Biology*, 179(2), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.05.002>
188. Yawen, Z., Shimomura, O., Prasher, D., Chalfie, M., Tsien, R. (2000). Green fluorescent protein. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 27(3), 243.
189. Zakharov, I. A., & Yarovoy, B. P. (1977). Cytoconduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 14(1–3), 15–18. <https://doi.org/10.1007/BF01734159>
190. 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>
191. Zhou, P., Derkatch, I. L., Uptain, S. M., Patino, M. M., Lindquist, S., & Liebman, S. W. (1999). The yeast non-Mendelian factor [*ETA*⁺] is a variant of [*PSI*⁺], a prion-like form of release factor eRF3. *EMBO Journal*, *18*(5), 1182–1191. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1182>
 192. Zhouravleva, G. A., Bondarev, S. A., & Trubitsina, N. P. (2023). How big is the yeast prion universe? *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(14), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms241411651>
 193. Zoller, M. J. (1991). New molecular biology methods for protein engineering. *Current Opinion in Structural Biology*, *1*(4), 605–610. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80084-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80084-3)

PRIEDAI

1 priedas

Tyrimė naudotos plazmidės: pRSCupSup35GFP, žiūrėti į **1 pav.** ir pJET1.2/blunt, žiūrėti į **2 pav.**



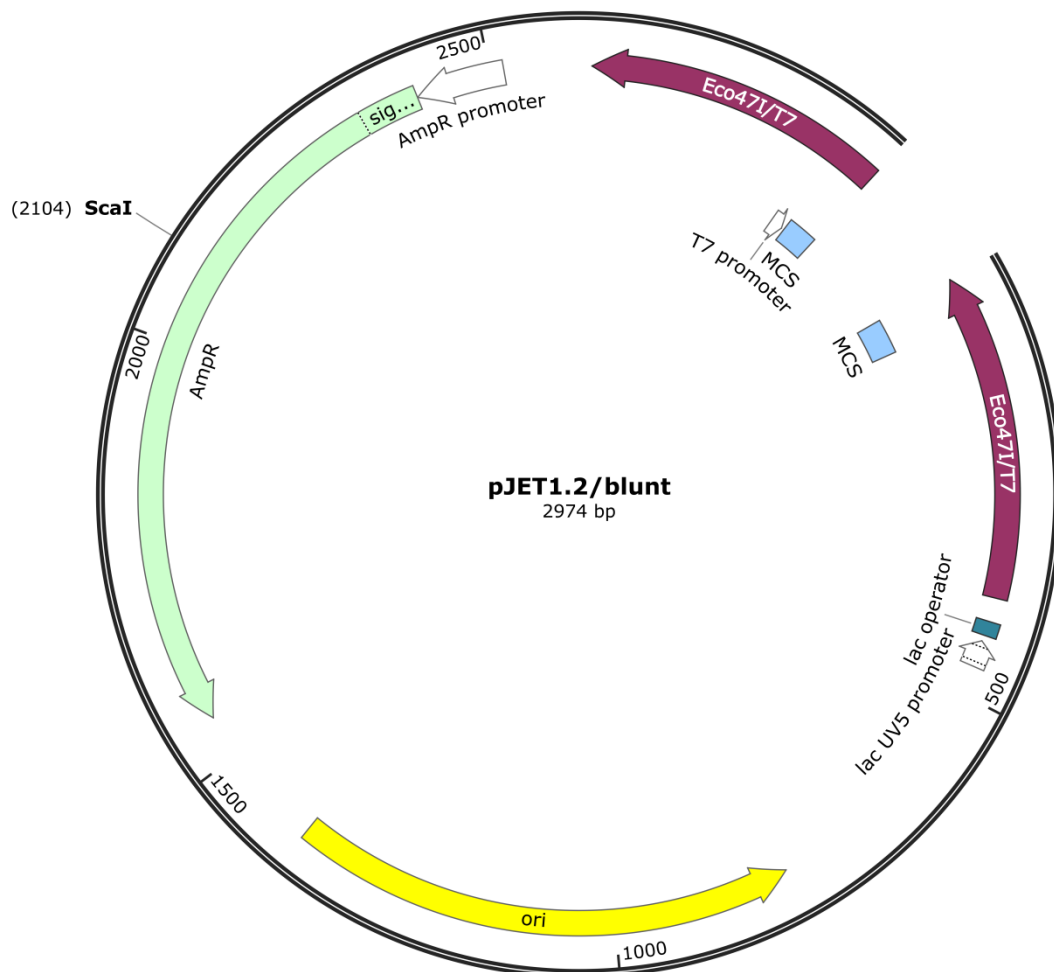
1 pav. pRSCupSup35GFP struktūra (Addgene.org; pakoreguota)
pRSCupSup35GFP plazmidė sukurta Susan Lindquist (Addgene plazmidė # 1087, RRID: Addgene_1087).

Plazmidės struktūrinės dalys pateiktos žemiau.

1. **Ori** (1–589 bp) – replikacijos pradžios seka. Ori yra ta vieta, nuo kurios prasideda DNR replikacija, leidžianti plazmidei daugintis, kadangi ji turi išlikti ląstelėse (Morgan, 2014).
2. **CAP prisijungimo vieta** (877–898 bp) – CAP baltymas (angl. *catabolic activator protein* – katabolinis aktyvatorinis baltymas, toliau CAP) jungiasi su efektorine molekule – cikliniu adenzino monofosfatu (cAMP) ir kompleksui prisijungus prie CAP prisijungimo vietos, esančios netoli *lac* promotoriaus, skatinama transkripcija: keičiama DNR struktūra, DNR

- išlinksta, kad lengviau prisijungtų polimerazė. Tai vyksta kai aplinkoje nėra gliukozės, bet yra laktozės (Lawson et al., 2004).
3. **Lac promotorius** (913–943 bp) – *E. coli lac* operono promotorius, naudojamas bendrai *lac* geno raiškiai. Konstitutyvus, kai nėra *lac* represoriaus (*lacI* ar *lacIq*). Gali būti indukuotas izopropilo-β-D-tiogalaktopiranozidu (angl. *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*, toliau IPTG) arba laktoze (Morgan, 2014).
 4. **Lac operatorius** (951–967 bp) – *lac* represorius jungiasi prie *lac* operatoriaus ir slopina transkripciją *E. coli*. Šis slopinimas gali būti pašalinta pridėjus laktozės arba IPTG (Glover et al., 1997).
 5. **M13 rev** (975–991 bp) – bendras sekoskaitos pradmuo (Glover et al., 1997).
 6. **T3 promotorius** (1012–1030 bp) – bakteriofago T3 RNR polimerazės promotorius, naudojamas *in vitro* transkripcijai. Konstitutyvus, bet reikia T3 RNR polimerazės (Morgan, 2014).
 7. **Ks primer** (1059–1075 bp) – bendras sekoskaitos pradmuo (Glover et al., 1997).
 8. **CUP1 pomotorius** (1496–1730 bp) – metalotioneino promotorius, kurio sužadinimą reguliuoja Cu²⁺ jonai (Glover et al., 1997). Transkripcijos veiksniai, kurie yra reikalingi daugumos mielių genų aktyvavimui, trūkumas neturi įtakos transkripcijos aktyvavimui nuo šio promotoriaus (Badi ir Barberis, 2002).
 9. **SUP35 genas** (1784–3840 bp).
 10. **GFP genas** (3845–4567 bp) – *Aequoria victoria* žalią fluorescuojantį baltymą koduojantis genas (Glover et al., 1997). GFP sulietas su *Sup35* genu, o tai leidžia pamatyti *Sup35* baltymo buvimą mielių ląstelėse dėl GFP fluorescencijos (Yawen, 2014).
 11. **T7 promotorius** (4590–4608 bp) – bakteriofago T7 RNR polimerazės promotorius. Naudojamas *in vitro* transkripcijai. Konstitutyvus, bet reikia T7 RNR polimerazės (Morgan, 2014).
 12. **M13 FWd** (4615–4632 bp) – bendras sekoskaitos pradmuo (Glover et al., 1997).
 13. **F1 ori** (4772–5227 bp) – bakteriofago f1 replikacijos pradžios seka; rodyklė indikuoja (+) grandinės sintezės kryptį (Glover et al., 1997). F1 yra iš fago gaunama ori, leidžianti replikuoti ir supakuoti viengrandininę DNR į fago daleles. Plazmidės, turinčios iš fago gautą ori, vadinamos fagemidėmis. F1 bakteriofago DNR replikacijos kilmė veikia kaip signalas ne tik viruso grandinės sintezės inicijavimui, bet ir jos nutraukimui (Dotto et al., 1984).
 14. **URA3** (5358–6161 bp) – produktas – orotidino-5'-fosfato dekarboksilazė, reikalinga uracilo biosintzei. Tai yra auksotrofinis mielių žymuo, jį turinčios mielės auga terpėje su 5'-fluoroorotinė rūgštimi (angl. *5'-fluoroorotic acid* (5'FOA) (Patrick, 2014). Taip pat, ląstelėms, turinčioms plazmidę su *URA3* augimo terpėje nėra būtinas uracilas.

15. **URA3 promotorius** (6162–6337 bp) – seka, reikalinga *URA3* transkripcijos iniciacijai.
16. **CEN/ARS** (angl. *autonomously replicating sequence* – autonomiškai besireplikuojanti seka) (6639–7142 bp) – *S. cerevisiae* VI-tos mielių chromosomos centromeros (CEN6) sekos dalis sulieta su ARS. Šie vektoriai yra stabilūs, be integracijos į genomą (Patrick, 2014).
17. **AmpR promotorius** (7179–7283 bp) – seka, reikalinga AmpR transkripcijos iniciacijai.
18. **AmpR** (1 segmentas (7284–8144 bp) 2 segmentas (7353–8144 bp) – produktas – β -laktamazė, suteikia atsparumą ampicilinui, karbencilinui ir giminingiems antibiotikams (Glover et al., 1997).



2 pav. pJET1.2/blunt plazmidės struktūra (Snapgene.com; pakoreguota)

Plazmidės struktūrinės dalys pateiktos žemiau.

1. **MCS** (1–51 bp ir 2931–2974 bp) – daugiakopijinė klonavimo vieta (Snapgene.com).
2. **Ori** (792–1380 bp).
3. **lac UV5 promotorius** (435–465 bp)– *E. coli lac* promotorius su mutacija skatinančia transkripcijos iniciaciją (Snapgene.com).

4. **lac operatorius** (411–427).
5. **Toksino genas (Eco47I/T7 restrikcijos endonukleazė)** (1–382 bp ir 2619–2974 bp) – mutantinė Eco47I restrikcijos endonukleazės versija. Sukarpo dvigrandę DNR GGWCC vietoje, nesant apsauginiam metiliniui (Snapgene.com).
6. **AmpR promotorius** (2412–2516 bp).
7. **AmpR** (1551–2411 bp).
8. **ScaI** (2104 bp vieta) – kirpimo vieta reikalinga plazmidės restrikcijai iki linijinės formos.