



Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras

Mikrobiologijos bakalauro studijų programos
4 kurso studentas
KAZYS ŽITKUS

Bakalauro baigiamasis darbas
**ETANOLAMINŲ ĮTAKA [PSI] PRIONO ATsirADIMUI
SACCHAROMYCES CEREVISIAE LĄSTELĖSE**

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

Vilnius
2024

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Neurodegeneracinės ligos žinduoliuose	7
1.1.1. Prionų baltymai.....	7
1.1.2. Prionų variantai.....	9
1.1.3. Prioninės ligos žinduoliuose	10
1.1.4. Prioninių ligų nustatymas	11
1.2. Modelinė <i>S. cerevisiae</i> sistema.....	12
1.2.1. Mielų prionai	13
1.2.2. Mielų [PSI ⁺] prionas	14
1.2.3. [PSI ⁺] priono formavimasis ir plitimas.....	17
1.3. Etanolaminas	19
1.3.1. Dietanolaminas ir trietanolaminas	20
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	23
2.1. Medžiagos.....	23
2.1.1. Reagentai	23
2.1.2. Prietaisai	23
2.1.3. Kultivavimo terpės	23
2.1.4. Tirpalai.....	24
2.2. Metodai	25
2.2.1. Tyrimo objektas.....	25
2.2.2. Ląstelių paruošimas	25
2.2.3. Mikroplokštelių praskiedimo metodas	26
2.2.4. Ląstelių augimo ir prionizacijos kreivių sudarymas	27
2.2.5. Kultūrų grynumo tikrinimas	27
2.2.6. Statistinė analizė	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1. Ląstelių paruošimas	28
3.2. <i>S. cerevisiae</i> 74D-694 kamieno ląstelių augimas su skirtingomis etanolaminų koncentracijomis	29

3.2.1. Monoetanolamino poveikis <i>S. cerevisiae</i> 74D-694 [<i>psi</i> ⁻], [<i>PSI</i> ⁺] ^W ir [<i>PSI</i> ⁺] ^S ląstelių augimui	29
3.2.2. Dietanolamino poveikis <i>S. cerevisiae</i> 74D-694 [<i>psi</i> ⁻], [<i>PSI</i> ⁺] ^W ir [<i>PSI</i> ⁺] ^S ląstelių augimui....	32
3.2.3. Trietanolamino poveikis <i>S. cerevisiae</i> 74D-694 [<i>psi</i> ⁻], [<i>PSI</i> ⁺] ^W ir [<i>PSI</i> ⁺] ^S ląstelių augimui...	35
3.3. <i>S. cerevisiae</i> 74D-694 [<i>psi</i> ⁻] ląstelių prionizacija	40
3.3.1. Monoetanolamino poveikis prionizacijai	40
3.3.2. Dietanolamino poveikis prionizacijai	43
3.3.3. Trietanolamino poveikis prionizacijai	44
IŠVADOS.....	50
SANTRAUKA	51
SUMMARY	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	53
PRIEDAI	57
1 priedas.....	57
2 priedas.....	57

SANTRUMPOS

AFM	Atominės jėgos mikroskopija
AIR	Amino imidazolo ribotidas (angl. <i>aminoimidazole ribotide</i>)
CJD	Creutzfeldt-Jakob liga
CPD	Kupranugarių prionų liga
CSF	Cerebrospinalinis skystis
CWD	Lėtinė išsekimo liga
DEA	Dietanolaminas
DMEM	Bulbecco modifikuota erelio terpė
eRF1	Eukariotinis transliacijos terminacijos faktorius (Sup45 baltymas)
eRF3	Eukariotinis transliacijos terminacijos faktorius (Sup35 baltymas)
ETA	Etanolaminas
GSE	Galvijų spongiforminė encefalopatija
GSS	Gerstmann-Straussler-Scheinker liga
YNB	Mielių azoto bazė
YPD	Mielių ekstrakto, dekstrozės ir peptono turtinga terpė
MDEA	Metilo dietanolaminas
MEA	Etanolaminas (monoetanolaminas)
NDD	Neurodegeneracinės ligos
NMR	Branduolio magnetinis rezonansas
NR	Oligopeptidų pasikartojimų regionas
NTP	Nacionalinė toksikologijos programa
PE	Fosfatidiletanolaminas
PK	Proteinazė K
PrD	Priono domenas
PrP	Priono baltymas
PrP ^C	Ląstelinis priono baltymas (fiziologinis)
PrP ^{Sc}	Skrepi ligos priono baltymas (pakitusios struktūros)
QN	Glutamino turtingas ruožas
ROS	Reaktyviosios deguonies rūšys
RT-QuIC	14-3-3 baltymo ir realaus laiko drebjimo sukelta konversija
SAICAR sintazė	Fosforibosilaminoimidazolo-sukcinkarboksamido sintazė

SC	Sintetinė turtinga terpė
Sup35C	C-terminalo paleidimo faktoriaus domenas
Sup35M	Vidurinio sisiejimo domenas
Sup35N	Priono domenas N-galuose
TEA	Trietanolaminas
TME	Užkrečiamoji audinės encefalopatija
USE	Užkrečiamoji spongiforminė encefalopatija
WT	Laukinis tipas

IVADAS

Prionai, infekcijos sukėlėjai, yra netaisyklingai susilankstę baltymai. Priono baltymo (PrP^{C}) ląstelinė forma yra fiziologinė, aptinkama visuose žinduolių audiniuose. Jo ypač gausu centrinėje nervų sistemoje (CNS), kur dalyvauja įvairių neurodegeneracinių ligų (NDD) patogenezėje. Baltymas yra arba substratas konversijai, replikacijai ir kaupimuisi į patogeninę izoformą, išreikštą prionu ar PrP^{Sc} , arba jis taip pat gali būti naudojamas kaip kitų baltymų, dalyvaujančių neurodegeneraciniuose sutrikimuose, amiloidinių formų receptorių (Mead and Reilly, 2015). Dažniausia aptinkama prionų liga žmogaus organizme yra Creutzfeldt-Jakob liga (CJD). Gyvūnų tarpe paplitusios ligos yra galvijų spongiforminė encefalopatija, mirtina degeneracinė avių ir ožkų nervų sistemos liga – skrepi (Shim *et al.*, 2022).

Prioniniai baltymai yra tiriami jau kurį laiką, tačiau vaisto nuo prionų sukeltų ligų iki šiol neatrasta. Siekiant geriau suprasti prioninių baltymų veikimą yra pasitelkiamos modelinės sistemos, tokios kaip *Saccharomyces cerevisiae*, viena iš gerai ištirtų mielių rūšių, kuri yra naudojama pramonėje bei moksliniuose tyrimuose (Chernoff *et al.*, 2020). Yra ieškoma ne tik būdų išgydyti progresuotą prioninę ligą, bet ir junginių, galinčių slopinti ligos plitimą ar jos formavimąsi. Etanolaminas yra laikomas naujai atrastu anti-prioniniu junginiu, kuris gali sumažinti PrP^{Sc} kiekį prionais užkrėstose ląstelėse (Uchiyama *et al.*, 2021). Todėl tyrimo metu buvo pasirinkti 3 skirtingi etanolaminų junginiai ir tirtas kiekvieno iš jų poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 ląstelių augimo bei prionizacijos procesui. Tyrimo rezultatai gali prisidėti prie gilesnio supratimo apie etanolaminų poveikį mielių ląstelių biologiniams procesams ir prioninio baltymo Sup35 veiklai.

Darbo tikslas:

Nustatyti etanolaminų: monoetanolamino, dietanolamino ir trietanolamino įtaką $[\text{PSI}]$ priono susidarymui *S. cerevisiae* 74D-694 kamieno ląstelėse.

Darbo uždaviniai

1. Įvertinti etanolaminų tirpalų įtaką *S. cerevisiae* 74D-694 $[\text{psi}^-]$, $[\text{PSI}^+]^{\text{W}}$ ir $[\text{PSI}^+]^{\text{S}}$ ląstelių augimo dinamikai.
2. Nustatyti koncentracijas, kuriose *S. cerevisiae* 74D-694 $[\text{psi}^-]$, $[\text{PSI}^+]^{\text{W}}$ ir $[\text{PSI}^+]^{\text{S}}$ kamienų ląstelės auga statistiškai patikimai taip pat, kaip be etanolaminų.
3. Įvertinti etanolaminų įtaką *S. cerevisiae* 74D-694 $[\text{psi}^-]$ ląstelių prionizacijos dinamikai.

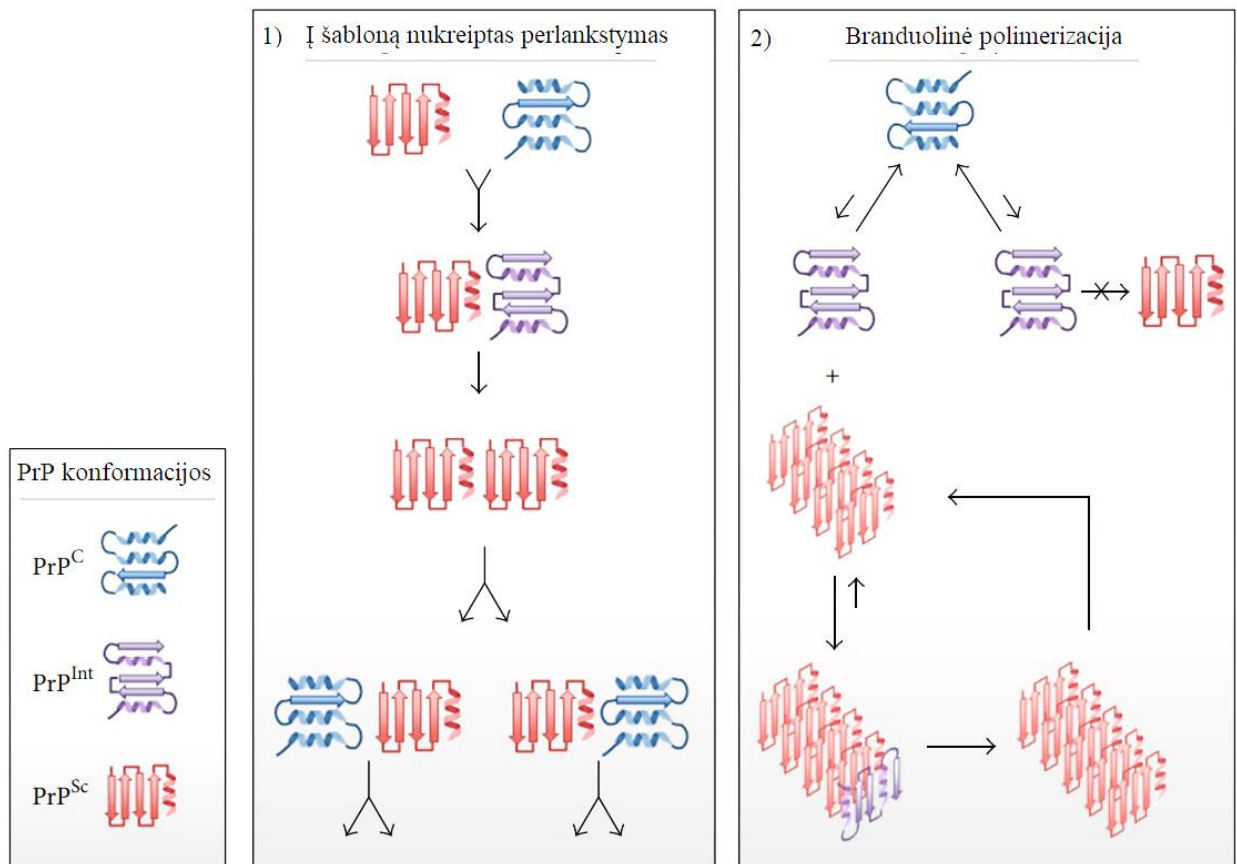
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Neurodegeneracinės ligos žinduoliuose

Neurodegeneracinės ligos – tai atsitiktiniai arba paveldimi centrinės nervų sistemos sutrikimai, dėl kurių lėtai progresuoja tam tikrų neuronų populiacijų ir jų jungčių funkcijos. Pagrindinis neurodegeneracinių ligų požymis – įprastinės baltymo formos pakitimas, dėl kurio gali susidaryti amiloidinės fibrilės (Reith, 2018). Tiek prioninės (avių ir ožkų skrepi liga, galvijų spongiforminė encefalopatija, žmogaus Creutzfeldt-Jakob liga, Kuru), tiek neprioninės neurodegeneracinės ligos (frontotemoralinė demencija, Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ligos) yra susijusios su fibrilinių baltymų agregatų, tokių kaip tau, amiloidas- β , α -sinukleinas ir poliglutamino baltymai, kaupimu. Nors prionų ligos yra apibūdinamos pagal jų užkrečiamumą, dauguma prioninių ligų atvejų iš tikrųjų atsitiktinai atsiranda dėl laukinio tipo baltymų arba dėl paveldimų priono baltymų mutacijų. Svarbiausi prioninių ir neprioninių neurodegeneracinių ligų panašumai – fenotipinė įvairovė ir plintanti patologija (Frost and Diamond, 2010).

1.1.1. Prionų baltymai

Amiloidai yra pluoštiniai kryžminiai β baltymų agregatai, galintys daugintis per branduolių polimerizaciją. Savaimė išsilaikantys amiloidų pagrindu suformuoti baltymų konformatoriai suteikia molekulinį pagrindą užkrečiamoms (infekcinėms ar paveldimoms) baltymų izoformoms, vadinamoms prionais. Priono baltymas (PrP) yra su membrana surištas glikoproteinas, randamas visų žinduolių ir paukščių rūšių centrinėje nervų sistemoje (CNS). Modifikacija po transliacijos pašalina pirmąsias 22 aminorūgščių liekanas PrP N-gale, kad įgautų brandų PrP. Baltymas yra pririštas prie išorinio ląstelių membranų paviršiaus glikozilfosfatidilinozitolio inkaru jo C gale (Millhauser, 2007). PrP gali egzistuoti 2 skirtingomis konformacijomis: šeimininko koduojamu fiziologiniu ląstelių priono baltymu (PrP^C), kuris dažniausiai lokalizuojasi neuronų membranose, Goldžio komplekse bei sekrecinėse pūslelėse ir patogenine izoforma, atsakinga už užkrečiamąsias spongiformines encefalopatijas (USE), dažniausiai vadinama PrP^{Sc}. PrP^{Sc} – šis ligą sukeliantis prionas yra atsparus proteazėms. Jis pakeičia PrP^C, paveikdamas jo konformaciją (Legname, 2017). Konformacinio „užkrečiamumo“ modeliai yra vaizduojami 1.1 pav.



1.1 pav. Siūlomi PrP^{Sc} sukkelto klaidingo PrP^C sulankstymo modeliai. Priono baltymas paprastai įgauna daugiausia α -spiralinę struktūrą homeostatinėmis ląstelių sąlygomis (PrP^C). PrP^C gali klaidingai susilankstyti iki vyraujančios β -klosčių struktūros ir taip įgyti infekcinę ir ligas sukeliančią konformaciją (PrP^{Sc}). Pereinant nuo PrP^C prie PrP^{Sc} (PrP^{Int}, aiškumo dėlei žymima kaip viena struktūra), galima priimti daug galimų tarpinių kintamos antrinės struktūros konformacijų, sudėties. 1) Į šabloną nukreiptas modelis rodo, kad PrP^{Sc} suaktyvina PrP^C skatinamą klaidingo lankstymo kaskadą, kurioje PrP^C yra reakcijos substratas, o naujai sukurtas PrP^{Sc} konvertuoja PrP^C molekules. Šiame kontekste PrP^{Sc} sumažina energijos barjerą, kuris riboja spontanišką PrP^C konversiją į PrP^{Sc}. 2) Branduolinės polimerizacijos modelis apibūdina termodinamiškai valdomą, nekatalizinę, branduolinės polimerizacijos reakciją, kurioje PrP^C konversija į PrP^{Sc} yra grįžtamas procesas. PrP^C yra labai palankus pusiausvyrai, o netinkamas lankstymas įvyksta tik kontaktuojant su PrP^{Sc} agregatu. PrP^{Sc} konformacija stabilizuojama, kai į agreguojančią „sėklą“ pridedamas naujai netinkamai sulankstytas baltymas. Pagrindinė šio antrojo modelio pasekmė yra ta, kad užkrečiamumas priklauso nuo PrP^{Sc} oligomerų buvimo, nes monomerai nėra užkrečiami (adaptuota pagal Marciniuk *et al*, 2013).

PrP^{Sc} baltymas taip pat sudaro labai struktūrizuotus amiloidinius pluoštus. Pluošto galas veikia kaip šablonas kitiems laisviems baltymams prisitvirtinti (Legname, 2017). Pirminė PrP^C struktūra gali būti suskirstyta į N-galo nestruktūrizuotą, iš esmės netvarkingą baltymą ir gerai struktūrizuotą bei apibrėžtą C-galo fragmentą (Legname, 2023). PrP^C koduoja *PRNP* genas, esantis žmonių 20 chromosomoje ir pelių (*Prnp*) 2 chromosomoje. Priklausomai nuo nagrinėjamos rūšies, *PRNP* genas turi arba 2, arba 3 egzonus, o visas koduojantis regionas yra paskutiniame egzone, todėl galimas alternatyvus sujungimas. Nestruktūrizuotą N-terminalo domeno didžiąją dalį sudaro oktapeptidiniai pasikartojimai, būdingi tik

PrP^C, kurie yra unikalūs tarp visų baltymų. Šiuose oktapeptidinių pasikartojimų regionuose, kurių bendra seka yra PHGGGWGQ, yra histidino liekanų, galinčių surišti vienvalenčius ir dvivalenčius katijonus, tokius kaip vario jonai Cu⁺ ir Cu²⁺ (Legname, 2017).

1.1.2. Prionų variantai

Vienas iš mįslingiausių reiškinių priono biologijoje yra priono variantų egzistavimas. Priono variantai apibrėžiami kaip infekciniai izoliatai, kurie perduodami identiškiems šeimininkams, pasižymi skirtingais priono ligos fenotipais. PrP^{Sc} gali įgyti keletą su liga susijusių konformacijų, kurios visos gali sukelti ir perduoti ligą. Ligos fenotipus lemia specifinė PrP^{Sc} konformacija užkrėstojo audiniuose. Netiesioginiai įrodymai rodo, kad variantų fenotipai gali būti užkoduoti skirtingose PrP^{Sc} konformacijose, turinčiose skirtingas savybes, pavyzdžiui, stabilumą prieš chaotropines druskas ir temperatūrą (Aguzzi *et al.*, 2007).

Priono variantų variaciją 1961 m. pirmą kartą pasiūlė Pattisonas ir Millsonas, kurie eksperimentiškai skrepi liga užkrėstose ožkose nustatė skirtingus klinikinius fenotipus. Nuo konformacijos priklausomame imuniniame tyrime su Sirijos žiurkėnais, buvo įrodyta, kad kiekvienas iš aštuonių prionų variantų turi unikalios konformacijos PrP^{Sc} molekulę, kuriomis užkrėtus graužikus išsivysto skirtingos USE formos. Tai rodo, kad prionų variantų biologinės savybės yra „užšifruotos“ PrP^{Sc} konformacijoje (Safar *et al.*, 1998). Dabartiniai duomenys rodo, kad pagrindinis skirtumas tarp priono variantų yra skirtingi konformaciniai dariniai, kuriuos įgyja PrP^{Sc}. Šios infekcinės dalelės „perduoda“ savo konkrečius konformacinius motyvus į paprastai sulankstytus baltymus, išreikštus šeimininke, todėl atsiranda specifinių ligos požymių (Morales, 2017). Pastebėta, kad priono baltymo amiloidinės fibrilės gali egzistuoti keliomis skirtingomis struktūrinėmis konformacijomis. *In vitro* gali susidaryti skirtingi variantai, priklausomai nuo aplinkos sąlygų, kuriomis susidaro agregatai, pvz., pH, denatūrantas ar druskos koncentracija. Nors procesas, kaip ir kodėl baltymas su lygiai tokia pačia seka gali turėti keletą skirtingų fibrilinių struktūrų, kelia didelį susidomėjimą ir yra plačiai tiriamas, dėl to kyla problemų analizuojant ir lyginant duomenis. Skirtingi variantai turi skirtingą morfologiją ir antrines struktūras, replikacijos greitį, stabilumą denatūrantuose (Ziaunys *et al.*, 2020).

Prionų variantai gali būti klasifikuojami pagal skirtingus parametrus. Inkubaciniai periodai, histologinio pažeidimo profiliai ir klinikiniai požymiai yra pagrindiniai *in vivo* skiriamieji požymiai, naudojami prionų variantams atskirti. Be *in vivo* skirtumų, kiekvienas priono variantas yra susijęs su specifine PrP^{Sc} charakterizuojančių biocheminių savybių grupe. Tarp jų dažniausiai naudojamas elektroforezinis mobilumas po iš dalies atsparaus proteinazės K (toliau – PK) skaidymo, glikozilinimo

modelis, PK atsparumo laipsnis, sedimentacija ir atsparumas denatūravimui chaotropinėmis medžiagomis (Solforosi *et al.*, 2013).

Ankstesni tyrimai rodo, kad skirtingus priono variantus sukelia struktūrinis polimorfizmas infekciniame priono amiloide. Pavyzdžiui, Sup35NM yra mielių priono baltymo Sup35 N-galo ir vidurinio domeno struktūriškai netvarkinga forma. Šis baltymas yra svarbus $[PSI^+]$ priono būsenos formavimuisi. Amiloidinės skaidulos, susidariusios iš Sup35NM, gali įgyti skirtingas konformacijas priklausomai nuo temperatūros: 4 °C temperatūroje formuojasi laukinio tipo (WT-4) konformacija ir 37 °C temperatūroje – (WT-37). Įvedus šiuos skirtingus konformacinius variantus į mielių ląsteles, sukurama mitotiškai stabilių stiprių ir silpnų $[PSI^+]$ variantų. Be to, taškinės mutacijos aminorūgščių sekoje gali pakeisti ląstelių fenotipus, susijusius su amiloidogeniniu baltymu. Taškinė Sup35 mutacija, kai 17 serinas pakeičiamas argininu (S17R), sukelia būdingą mitotiškai nestabilų, silpną $[PSI^+]$ variantą, o kodono polimorfizmas žmogaus priono baltymo liekanoje 129 sukelia Creutzfeldt-Jakob ligos klinikinę įvairovę (Ohhashi *et al.*, 2018).

1.1.3. Prioninės ligos žinduoliuose

Šiuo metu yra žinoma jau nemažai prioninių ligų, kurias sukelia pakitęs įprasto baltymo susilankstymas. Pirmoji pripažinta prionų liga, užkrečiamoji spongiforminė encefalopatija, pasižymi ilgu inkubaciniu periodu, kurio metu liga vystosi, bet dar nesukelia pastebimų simptomų. USE pasitaiko ir prijaukintose avių ir ožkų (skrepi), galvijų (galvijų spongiforminės encefalopatijos, GSE) ir audinių (užkrečiamosios audinės encefalopatija, TME) populiacijose. Lėtinė išsekimo liga (CWD) yra unikali tarp USE, nes ji gali paveikti tiek laukines, tiek namines elnių populiacijas (Parry *et al.*, 1976; Kahn *et al.*, 1975; Rainsford, 1975). Neseniai buvo nustatyta kupranugarių prionų liga (CPD) naminių kupranugarių kuprose, tačiau geografinis pasiskirstymas ir perdavimo galimybė laukinėms populiacijoms nežinoma (Babelhadj *et al.*, 2018). Žmogaus USE gali būti infekcinės (Kuru), paveldimos (Gerstmann-Straussler-Scheinker, GSS) arba sporadinės (Creutzfeldt-Jakob liga, CJD) etiologijos (Imran and Mahmood, 2011; Holec *et al.*, 2020).

Prioninės ligos gali būti skirstomos į atsitiktines, paveldimas arba infekcines. Sporadinė liga, kai atsitiktinai PrP^C susiklosto su PrP^{Sc} yra labiausiai paplitusi ir sudaro maždaug 85–90% žmogaus ligos atvejų. Paveldimos ligos paprastai kyla dėl mutacijų C-galo srityje. Priešingai polimorfizmai ar mutacijos oktarekartinėje srityje yra reti, nuo 10 % iki 15 % CJD atvejų sukelia priono baltymo geno mutacijos. Sporadinės ir paveldimos prioninės ligos priskiriamos tai pačiai klasei kaip ir Alzheimerio bei Parkinsono ligos, nes jos visos yra susijusios su endogeninių baltymų agregatų kaupimu. Kaip minėta anksčiau,

prionų ligos skiriasi tuo, kad jos yra infekcinės. Smegenų medžiaga iš sergančių gyvūnų (pelių, žiurkėnų, primatų) patekusi į sveikus gyvūnus sukelia USE simptomus ir su tuo susijusį infekcinio PrP^{Sc} kaupimąsi (Millhauser, 2007). Visoms prioninėms ligoms būdingi bruožai – CNS pažeidimai, ilgas inkubacinis laikotarpis ir progresuojanti, visada mirtina liga. Taip pat būdingos neuropatologinės savybės, įskaitant neuronų žūtį, spongiforminius pokyčius, reaktyviąją gliozę, amiloidines PrP^C plokšteles ir dideles vakuoles, sukeliančias tipiską galvos smegenų kempinligę (Ortega-Cubero *et al.*, 2013).

1.1.4. Prioninių ligų nustatymas

Nepriklausomai nuo prioninių ligų tipo, iš anksto diagnozuoti ligą yra sudėtinga dėl didelio fenotipinio kintamumo, dažniausiai pasireiškiantys simptomai yra greitai progresuojanti demencija, smegenėlių ataksija ir mioklonusas. Pasirodžius pirmiesiems simptomams vidutinė gyvenimo trukmė yra šeši mėnesiai, tačiau susiduriama su dideliais klinikinės ligos trukmės svyravimais, besitęsiančiais nuo kelių savaičių iki metų (Altuna *et al.*, 2022). Nors dar nėra išrastų vaistų ar įrodytų prioninės ligos gydymo būdų, bet koks norimas sukurti gydymo būdas reikalauja ankstyvos ligos diagnozės, norint sustabdyti ir neleisti ligai plisti, progresuoti organizme.

Šiuo metu nėra patvirtinto testo, leidžiančio nustatyti ligą gyvam gyvūnui. Prioninės ligos dažniausiai diagnozuojamos kliniškai ir patvirtinamos pomirtiniu smegenų audinio histopatologiniu tyrimu. Vienintelis patikimas molekulinis prioninių ligų žymuo yra PrP^{Sc}, patologinis priono baltymo konformeris, besikaupiantis centrinėje nervų sistemoje ir kiek mažesniu mastu limforetikuliniuose audiniuose. Vienintelis būdas patvirtinti GSE buvimą yra patikrinti gyvūno smegenų audinį jam nugaišus. GSE atveju dabar yra keletas komercinių diagnostikos būdų, pagrįstų pomirtiniu imunocheminiu PrP^{Sc} nustatymu smegenų kamieno sklėsčio (angl. *obex*) dalyje. Siekiant patvirtinti GSE ligą galvijuose, dažniausiai naudojami tokie metodai kaip su fermentais susietas imunosorbento tyrimas (ELISA), imunohistochemija ir Western blot tyrimas. Šie greitieji atrankos testai buvo naudojami aktyviai stebint GSE ir labai pagerino užkrėstų galvių aptikimą prieš jiems patenkant į žmonių maisto grandinę. Neuropatologinis tyrimas paprastai atskleidžia gilią astrocitinę gliozę ir spongiforminius pokyčius, kartais kartu su amiloido nuosėdų susidarymu. Devintajame dešimtmetyje buvo nustatyta, kad bendras USE požymis buvo pakitusios šeimininko koduojamo PrP izoformos kaupimasis sergančių gyvūnų ir žmonių smegenyse. Skirtingai nuo kitų infekcinių ligų, kurias sukelia virusai ar bakterijos, prionines ligas sunku diagnozuoti naudojant įprastinius metodus, tokius kaip PGR, serologiniai ar ląstelių kultūros tyrimai. Taip yra todėl, kad infekcinis agentas arba prionas neturi nukleorūgšties komponento ir susideda tik iš neįprastai sulankstyto natyvaus šeimininko baltymo PrP konformerio, kurio užkrėstas

organizmas neatpažįsta kaip svetimo, todėl nepastebima nei uždegiminių, nei imunologinių atsakų. Laboratorinę USE diagnostiką dar labiau apsunkina netolygus USE sukėlėjų pasiskirstymas kūno audiniuose – didžiausios koncentracijos nuolat randamos nervų sistemos audiniuose, o labai mažos – lengvai pasiekiamuose kūno skysčiuose, pavyzdžiui, kraujyje ar šlapime (Kübler *et al.*, 2003).

Labai svarbu yra anksti ir tiksliai diagnozuoti prionines ligas, todėl pastaraisiais dešimtmečiais buvo siekiama sukurti biomarkerius, kurie greitai ir tiksliai diagnozuotų įvairias prionines ligas. Šiuo metu yra taikomi diagnostiniai kriterijai, pagrįsti klinikiniu fenotipu, taip pat neurovaizdiniais biomateriais (magnetinio rezonanso tomografija), neurofiziologiniais tyrimais (elektroencefalograma ir polisomnograma) ir smegenų skysčio biomateriais (14-3-3 baltymo ir realaus laiko drebinimo sukelta konversija (RT-QuIC)), skirtą prionų baltymams cerebrospinaliniame skystyje (CSF) aptikti (Altuna *et al.*, 2022).

1.2. Modelinė *S. cerevisiae* sistema

Daugiau nei prieš 20 metų buvo įrodyta, kad žinduolių PrP, ekspresuojamas mielių ląstelėse, *in vivo* gamina į PrP^{Sc} panašią konformaciją (Ma and Lindquist, 1999). Nuo tada *S. cerevisiae* buvo pripažintas vienu iš modelių, skirtų atlikti pagrindinius PrP^{Sc} amiloidų sukeliamų ligų tyrimus. Dėl auginimo sąlygų paprastumo ir galingų genetinių metodų prieinamumo mielės *S. cerevisiae* yra puiki modelinė sistema, skirta tirti molekulinis ir ląstelių mechanizmus, reguliuojančius amiloido susidarymą ir dauginimąsi, kurių daugelis tinka žinduoliams. Genetiniai metodai, leidžiantys išreikšti žinduolių ar žmogaus amiloidogeninius ir prionogeninius baltymus mielėse, leidžia tyrėjams pasinaudoti mielių pranašumais apibūdindami su liga susijusių baltymų savybes. Chimerinės konstrukcijos, kuriose naudojami žinduolių ir žmonių agregacijai linkę baltymai arba domenai, sujungti su fluoroforais arba endogeniniais mielių baltymais, leidžia citologiškai arba fenotipiškai nustatyti su liga susijusių baltymų agregaciją mielių ląstelėse (Chernoff *et al.*, 2020).

Kadangi *S. cerevisiae* yra vienaląstis organizmas, jis turi tam tikrų akivaizdžių apribojimų, taikomų neuromokslams. Tačiau mielių prionai yra plačiai ištirti ir žinoma, kad jie turi tam tikrų požymių su žinduolių priono baltymu ar kitais amiloidogeniniais baltymais, randamais Alzheimerio, Parkinsono ar Huntingtono ligų patogenezėje. Todėl mielės *S. cerevisiae* buvo plačiai naudojamos pagrindiniams baltymų agregacijos savybių *in cellulo* ir jų dauginimo tyrimams. Neseniai mielėmis pagrįstas tyrimas atskleidė, kad kai kurie žinduolių priono baltymo ir amiloido β_{1-42} regionai gali indukuoti ir dauginti mielių prionus. Tai vienas iš pavyzdžių, rodančių, kad evoliuciškai nutolę organizmai turi bendrus mechanizmus, lemiančius struktūrinę priono baltymų konversiją, todėl mielių ląstelės yra naudinga

žinduolių priono baltymo tyrimo sistema. *S. cerevisiae* taip pat buvo naudojamas kuriant naujas anti-priono junginių atrankos sistemas iš cheminių bibliotekų. Mielių tyrimai yra pigūs ir saugūs tyrėjui, todėl jie yra labai geras pasirinkimas atlikti išankstinę patikrą prieš tolimesnius bandymus sistemose, įtraukiančiose žinduolių ląsteles, užkrėstas prionais (Ishikawa, 2021).

1.2.1. Mielių prionai

Mielių prionai yra dominuojanti ne Mendelio epigenetinio paveldėjimo formos baltymai, o mielėse ir grybuose amiloido pagrindu pagaminti prionai kontroliuoja fenotipiškai aptinkamus paveldimus bruožus. Pavyzdžiui, *[URE3]*, *[SWT⁺]* ir *[GAR⁺]* prionai, esantys *S. cerevisiae*, padidina maistinių medžiagų stokojančių šaltinių augimą. *[URE3]* yra amiloido pagrindu pagamintas prionas, kurio įprasta funkcija yra azoto katabolizmo reguliavimas. Kai Ure2p iš esmės paverčiamas amiloidu, genai, koduojantys fermentus ir transporterius, reikalingus prastiems azoto šaltiniams naudoti, yra nuslopinami, nepaisant gero azoto šaltinio buvimui aplinkoje. *[PSI⁺]* yra Sup35 amiloidinis prionas, transliacijos pabaigos faktoriaus subvienetas. Kai didžioji dalis Sup35 tampa *[PSI⁺]* amiloidu, prionas įgalina transliacijos tęsimą už baigties kodono (Wickner *et al.*, 2019).

Mielių prionų variantai skiriasi fenotipo stiprumu, dauginimosi stabilumu, toksiškumu/letalumu, gebėjimu įveikti perdavimo tarp rūšių ar jų viduje barjerus, biocheminėmis ir fizinėmis savybėmis. Branduolinio magnetinio rezonanso (NMR) spektroskopija nustatė konformacinius skirtumus tarp *[PSI⁺]* mielių priono variantų, o atominės jėgos mikroskopija (AFM) atskleidžia variantui būdingus mielių priono fibrilio morfologijos skirtumus. Yra stiprios koreliacijos tarp baltymo priono formos biocheminių savybių ir mielių varianto fenotipo. Mielių priono fenotipo stiprumas atitinka padidėjusį baltymų agregatų trapumą. Mechanistiškai padidėjęs priono agregatų trapumas lemia greitą naujų laisvų galų susidarymą, pagreitinantį prionų susidarymą (Holec *et al.*, 2020).

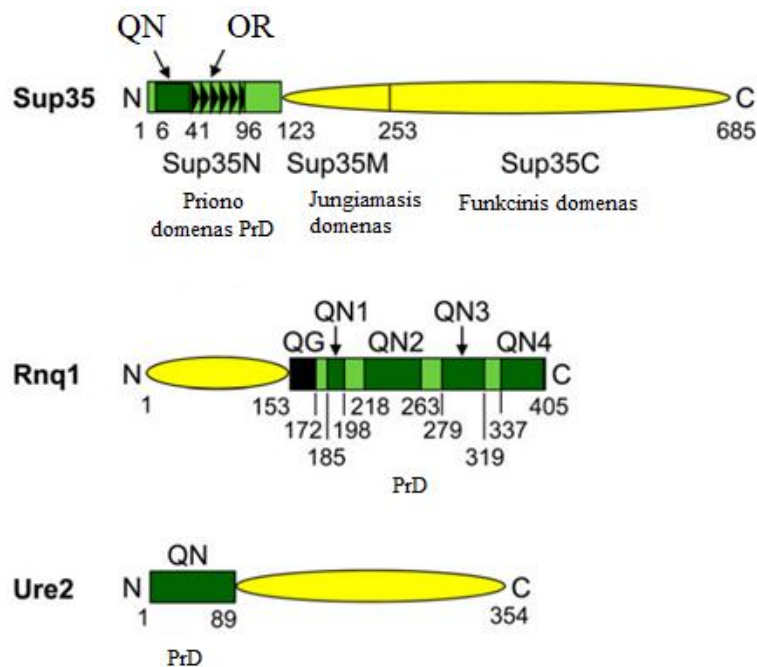
Mielių prionų baltymuose yra vadinamųjų priono domenų (PrD), kurie yra atsakingi už tarpmolekulinę sąveiką, dėl kurios susidaro amiloido ašis, ir bent jau kai kuriais atvejais skiriasi nuo domenų, atsakingų už pagrindines tų pačių baltymų ląstelinės funkcijas. Paprastai PrD yra kaip netvarkingi arba mažo sudėtingumo regionai (angl. *low complexity regions*) vietinėse (ne amiloido) baltymų struktūrose, o daugumoje žinomuose mielių prionų baltymuose yra PrD, kurie yra praturtinti glutamino ir (arba) asparagino aminorūgščių likučiais. Šiuo metu įrodyta, kad apie 10 mielių baltymų mielėse geba sudaryti amiloidinės struktūros prionus. Be to, buvo rasta įvairių aminorūgščių likučiais turtingų domenų, galinčių formuoti prioną, kai jie susilieja su reporterių konstruktais. Taip pat buvo įrodyta, kad apie 100 mielių baltymų turi aminorūgščių likučiais turtingus regionus, panašius į žinomus

PrD, ir nuo 1 % iki 4 % baltymų su tokiais regionais buvo rasta aukštesnių eukariotų, įskaitant žmonių, proteomuose (Chernoff *et al.*, 2020).

1.2.2. Mielių $[PSI^+]$ prionas

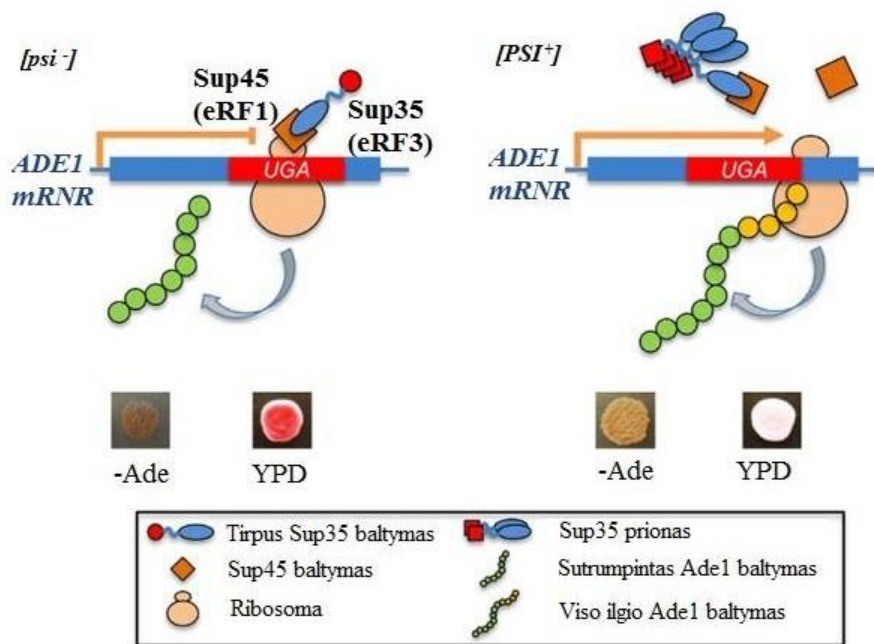
Prionai yra unikalūs baltyminiai infekciniai agentai, kurie gali įgyti alternatyvias konformacines būsenas, o priono forma yra susijusi su savaiminiu dauginimu ir agregacija. Šie priono tipo reiškiniai buvo plačiai ištirti mielėse, kur buvo nustatyti keli prioną formuojantys baltymai. Geriausiai apibūdinti mielių prionus formuojantys baltymai yra translacijos terminacijos faktorius Sup35, priono formoje žymimas $[PSI^+]$, ir azoto metabolizmo posttranskripcijos reguliatorius Ure2, priono formoje žymimas $[URE3]$. Sup35/ $[PSI^+]$ sistema yra išsamiai ištirta (Cox and Tuite, 2018; Liebman and Chernoff, 2012) ir taikoma siekiant išsiaiškinti prionų biologiją. Eukariotinis translacijos terminacijos faktorius eRF3, mielių atitikmuo Sup35, susideda iš trijų domenų (1.2 pav.):

1. Priono domenas arba PrD N-galuose (Sup35N), kuriame yra asparagino bei glutamino turtingas ruožas (QN) ir oligopeptidų pasikartojimų regionas (NR);
2. Vidurinio susiejimo domenas (Sup35M), kuriame yra klasterių, praturtintų įkrautomis aminorūgščių liekanomis;
3. C-terminalinis paleidimo faktoriaus domenas (Sup35C), kuris yra būtinas ir esminis Sup35 funkcijai translacijos terminacijos procese bei ląstelių gyvybingumui palaikyti.



1.2 pav. Mielių prionų domenų pavyzdžiai. Prionų domenai (PrD) rodomi kaip žali stačiakampiai, o ne prionų sritys – kaip geltonos elipsės. QN vaizduoja regioną, kuriame gausu glutamino/asparagino; OR – oligopeptidų pasikartojimus (Sup35); QG – polimorfinius glutamino/glicino pasikartojimus (Rnq1). Skaičiai vaizduoja aminorūgščių pozicijas (adaptuota pagal Liebman *et al.*, 2012).

Sup35N paprastai yra nestruktūrizuotas, tačiau gali būti paverstas į kryžminę- β konformaciją, taip sudarant amiloido fibrilinę sąsą. Sup35N QN ruožas pirmiausia yra atsakingas už amiloido agregaciją ir paprastai yra įtrauktas į saugomą kryžminio- β „šerdį“, kai Sup35 sudaro amiloidą, o subdomenas NR vaidina svarbų vaidmenį skleidžiant priono būseną, greičiausiai per sąveiką su šaperono aparatu. Sup35N ir Sup35M domenai taip pat atlieka apsauginę funkciją įtraukiant Sup35 į grįžtamuosius skysčio lašelių ar hidrogelio mazgus, kurie susidaro streso metu, kai organizmas susiduria su žemu pH. Įkrautos aminorūgščių liekanos Sup35M domene veikia kaip pH jutikliai, palengvinantys skystų lašelių tirpinimą atsigaunant nuo pH įtempio. Taigi normaliomis sąlygomis Sup35M padeda išlaikyti Sup35 tirpioje būsenoje. Kai Sup35N įgauna priono konformaciją, jis imobilizuojamas į netirpius pluoštinius agregatus, dėl kurių sumažėja galimybės pasiekti terminacijos signalą, taip sukeliant baigties kodono praleidimą ir jo nenuskaitymą (Chernoff *et al.*, 2020). Specialiai sukurti mielių variantai su priešlaikiniu baigties kodonu, pavyzdžiui, geno *ADE1* (UGA mutacija *ade1-14*), naudojamos aptikti Sup35 prioną, [*PSI*⁺] fenotipiškai augant selektyvioje terpėje (pavyzdžiui, terpėje, kurioje trūksta adenino, – Ade *ade1-14* reporterio atveju) arba pagal spalvą visoje terpėje dėl polimerizuoto tarpinio produkto kaupimosi adenino biosintezės kelyje, suteikiant raudoną spalvą mielių ląstelėms. Sup35 priono buvimas [*PSI*⁺] sukelia agregatų arba amiloido pluoštų susidarymą, dėl kurių atsiranda defektų nuskaitant baigties kodonus. Esant agregatams, priešlaikinis baigties kodonas nėra nuskaitomas, todėl ląstelės gali pačios pasigaminti adenino. Adeninas yra galutinis produktas adenino biosintezės kelyje. Todėl, kai adenino biosintezės kelią sutrikdo [*PSI*⁺] priono buvimas, mielių ląstelės negali gaminti raudonojo pigmento, todėl formuoja įprastos baltos spalvos kolonijas. (1.3 pav.) (Chernoff *et al.*, 2020; Lemarre *et al.*, 2020).

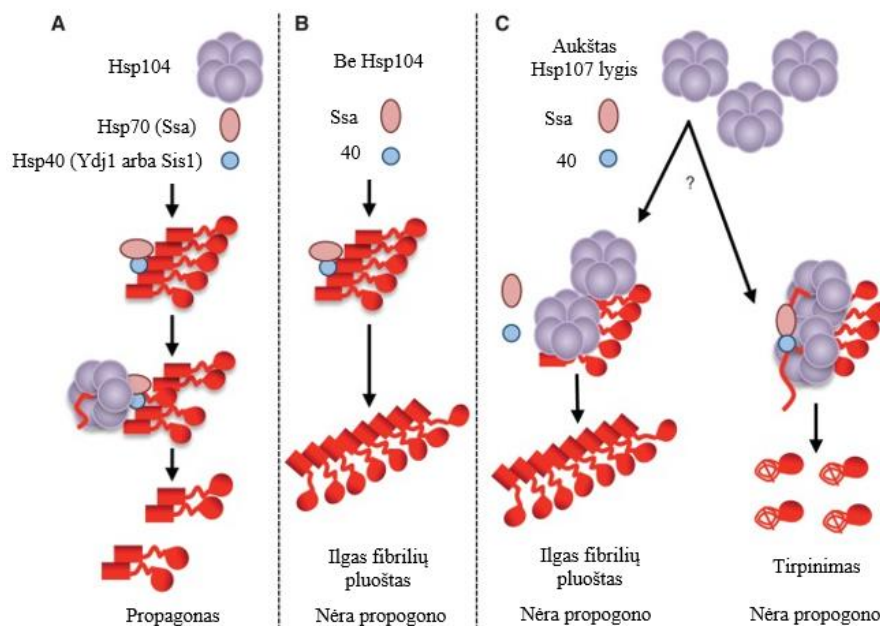


1.3 pav. Sup35/[PSI⁺] sistema mielėse. [PSI⁺] priono fenotipinio aptikimo tyrimas. Kairėje – tirpus Sup35 (eRF3) kartu su Sup45 (eRF1) veikia kaip translacijos terminacijos komplekso dalis [psi⁻] kamieno, turinčiame priešlaikinį baigties kodoną ADE1 gene. Nuskaičius šį priešlaikinį baigties kodoną, susidaro sutrumpintas Ade1 baltymas, dėl kurio mielių ląstelės negali augti terpėje, kurioje trūksta adenino (-Ade) ir ląstelės ima formuoti raudonos spalvos kolonijas augdamos turtingoje YPD terpėje. Dešinėje pusėje – Sup35 agregacija prionizuotose ląstelėse sumažina translacijos terminacijos komplekso gebėjimą pasiekti transliuojančias ribosomas, todėl priešlaikinis baigties kodonas nėra nuskaitomas. Ribosomos susintetina viso ilgio Ade1 baltymą, todėl ląstelės gali išgyventi terpėje be adenino (-Ade) ir neleidžia kauptis raudonam pigmentui YPD terpėje, formuojamos baltos spalvos kolonijos. Taip pat, paveiksle nurodomi tirpių ir agreguotų Sup35 formų pavadinimai, ribosomos naujai susintetinto Ade1 polipeptido pavadinimai (adaptuota pagal Chernoff *et al.*, 2020).

Kolonijų fenotipinis pokytis atsiranda dėl ADE1 geno mutacijos, kuri lemia SAICAR sintezės inaktyvinimą ir amino imidazolo ribotido (AIR) kaupimąsi ląstelėse. AIR polimerizuojasi ir sukelia raudoną pigmentaciją, ląstelėse, kurios neturi prionų. Jei Sup35 baltymas yra prionizuotoje formoje, tai reikia, kad translacijos terminacijos faktorius (eRF3) yra tik dalinai aktyvus ir priešlaikinis baigties kodonas nenuskaitomas. Dėl šios priežasties funkcionali SAICAR sintazės baltymo sintezė sustabdo raudono pigmento kaupimąsi ir ląstelės su prionais formuoja baltos spalvos kolonijas. Funkcionalaus Ade1 baltymo trūkumas [psi⁻] kamieno ląstelėse neleidžia joms augti SC terpėje be adenino, tačiau ant turtingos YPD terpės šios ląstelės kaupia raudonos spalvos pigmentą. [PSI⁺] kamienas, priešingai, gali augti SC terpėje be adenino ir ant turtingos terpės formuoja kolonijas, kurios gali būti šviesiai raudonos (silpnai prionizuotos) arba baltos (stipriai prionizuotos) spalvos (Fowler *et al.*, 1976; Nevzglyadova *et al.*, 2011).

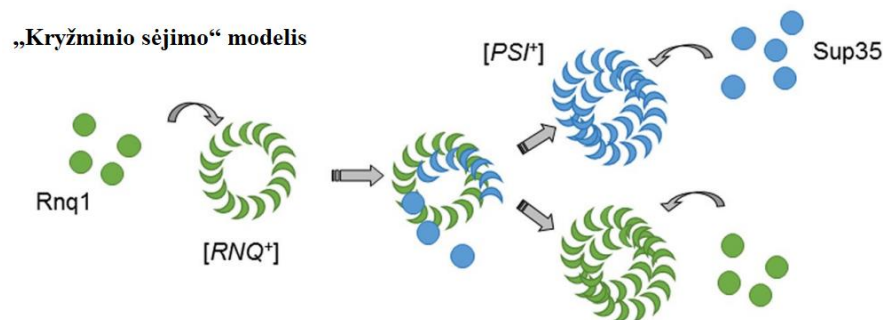
1.2.3. $[PSI^+]$ priono formavimasis ir plitimas

$[PSI^+]$ susidarymui ir palaikymui reikalinga Sup35 faktoriaus sąveika su endogeniniais ląstelių faktoriais (molekuliniai šaperonai Hsp104, Sis1 bei karščio šoko baltymai Hsp70). Molekuliniai šaperonai, baltymų grupė, kuri atlieka apsaugines funkcijas ląstelėje, perlankstydami arba išskaidydami denatūruotus baltymus, yra svarbūs ląstelių mechanizmų komponentai, reikalingi prionams susidaryti ir daugintis (Pirkkala, Nykänen and Sistonen, 2001). Ryšys tarp šaperonų ir prionų pirmą kartą buvo nustatytas parodant, kad $[PSI^+]$ replikacijos ciklui yra reikalingas šaperonas Hsp104, kuris dalyvauja baltymų skaidyme (Chernoff *et al.*, 1995). $[PSI^+]$ dauginimas priklauso nuo kelių šaperonų, įskaitant Hsp104, kurie tarpininkauja dauginimuisi skaidydami dideles fibriles į mažesnius oligomeres. Hsp104 taip pat reikalingas visiems kitiems žinomiems amiloido pagrindu susidariusiems citozoliniams mielių prionams. Dabartiniame citozolinių mielių prionų dauginimosi modelyje (1.4 pav.) vaizduojamas Hsp70/Hsp40 kompleksas, kuris pirmiausia jungiasi su prionų polimerais, o paskui jungiasi su Hsp104, kuris inicijuoja polimero suskaidymą, išskiriant atskiras baltymų molekules amiloidinės grandinės viduryje. Polimero suskaidymas sukuria „propagonus“, mažesnes „sėklas“, kurios yra būtinos norint pradėti naujus prionų plitimo etapus, taip pat prionų segregaciją. Nesant skaidymo proceso, nauji propagonai nesukuriami (1.4 pav. B), o prionai galiausiai praskiedžiami ir prarandami dalijantis ląstelėms. Sup35 baltymo atveju šaperono surišimą greičiausiai tarpininkauja arba moduliuoja PrD esančios oligopeptidų pasikartojimų sritis. Hsp vaidmuo priono dauginime yra pagrįstas jų pagrindinėmis evoliuciškai išsaugotomis fermentinėmis funkcijomis, nes *Escherichia coli* bakterijose esantys mielių ortologai Hsp104, Hsp70-Ssa ir Hsp40 baltymai gali iš dalies skleisti mielių prionus (Chernova *et al.*, 2017).



1.4 pav. Šaperonų vaidmuo dauginant Sup35 prioną. A) Polimerų fragmentacija ir propagono susidarymas esant normaliam Hsp104, Hsp70 ir Hsp40 baltymų kiekiui. B) Priono dauginimasis nesant Hsp104. C) Priono dauginimasis esant aukštam Hsp104 lygiui (adaptuota pagal Chernova *et al.*, 2017).

Nors spontaniškas prionų susidarymas yra ganėtinai retas reiškinys – dažnis svyruoja nuo 10^{-6} iki 10^{-8} , $[PSI^+]$ prionų susidarymą gali sukelti pernelyg didelė Sup35 baltymo priono domeno ekspresija. Pernelyg didelė Sup35 ekspresija padidina $[PSI^+]$ susidarymo dažnį, tikriausiai todėl, kad dėl didesnio baltymų molekulių skaičiaus yra didesnė tikimybė, kad nedidelė baltymų dalis netinkamai susilanksto ir sudaro prionus. Šią *de novo* prionų susidarymo indukciją labai sustiprina kitas prionas, vadinamas $[PIN^+]$ arba $[RNQ^+]$, kuris yra neįprastai sulankstyta Rnq1 baltymo priono forma. Nors buvo pasiūlytos kelios hipotezės, siekiant išsiaiškinti $[PIN^+]$ vaidmenį formuojant $[PSI^+]$, gerai palaikomas „kryžminio sėjimo“ modelis rodo (1.5 pav.), kad $[RNQ^+]$ prionas veikia kaip šablonas, skirtas kryžminti sėklą $[PSI^+]$ ankstyvosiose priono formavimo stadijose (Sharma *et al.*, 2017).



1.5 pav. $[RNQ^+]$ veikimo mechanizmo „Kryžminio sėjimo“ modelis. Sėjimo modelis rodo, kad formuojant $[PSI^+]$ yra fizinė sąveika tarp Sup35 ir agreguoto Rnq1. Tokiu būdu netinkamai sulankstytas ir agreguotas Rnq1 $[RNQ^+]$ būsenoje skatina Sup35 netinkamai susilankstyti, išlenkdamas monomerą

iš savo prigimtinės konformacijos arba formuodamas spontaniškai netinkamai sulankstyta monomerą į struktūrą, palankią prionų plitimui. Po sąveikos $[RNQ^+]$ ir $[PSI^+]$ prionai dauginasi nepriklausomai (adaptuota pagal Keefer *et al.*, 2017).

Yra manoma, kad *de novo* prionų susidarymą gali lemti ir oksidaciniai baltymo ne prioninės formos pažeidimai, kurie turi įtakos jo paveldimos priono konformacijos formavimuisi (Grant, 2015). Pavyzdžiui, žinduolių PrP metionino oksidacija buvo pasiūlyta siekiant pagrįsti klaidingus įvykius, kurie skatina konversiją į PrP^{Sc} , o metionino oksidacija destabilizuoja vietinį PrP, palengvindama klaidingą sulankstymą ir perėjimą prie PrP^{Sc} konformacijos. Įrodyta, kad oksidacinis stresas padidina mielių $[PSI^+]$ priono susidarymo dažnį. $[PSI^+]$ priono *de novo* susidarymas taip pat žymiai padidėja mielių mutantuose, kuriems trūksta pagrindinių antioksidantų, o tai rodo, kad endogeninės reaktyviosios deguonies formos (ROS) gali sukelti $[PSI^+]$ priono *de novo* susidarymą. Metionino oksidacijos prevencija per daug ekspresuojant metionino sulfoksido reduktazę panaikina perėjimą prie priono formos, o tai rodo, kad tiesioginė Sup35 oksidacija gali sukelti struktūrinius perėjimus, skatinančius jo konversiją į perduodamą amiloido formą. Taigi baltymų oksidacija gali būti bendras mechanizmas, kuriuo grindžiama kai kurių žinduolių ir mielių amiloidą formuojančių baltymų agregacija (Speldewinde *et al.*, 2017).

1.3. Etanolaminas

Etanolaminas, dar vadinamas 2-aminoetanoliu arba monoetanolaminu (dažnai sutrumpintas kaip ETA arba MEA), priklauso alifatinių aminoalkoholių klasei ir yra pirminis aminas ir pirminis alkoholis. Etanolaminas dėl savo paviršinio aktyvumo savybių turi antimikrobinį poveikį, o didelėmis koncentracijomis gali veiksmingai slopinti kai kurių mikroorganizmų augimą dirvožemyje (Kim *et al.*, 2010). Etanolaminas yra vertingas anglies ir (arba) azoto šaltinis bakterijoms, galinčioms jį katabolizuoti. Jis ypač paplitęs įvairių organizmų virškinimo trakte, kuriame gausu membranų dėl žarnyno epitelio apykaitos ir nuolatinės mikrobiotos. Įdomu tai, kad daugelis žarnyno patogenų turi *eut* (etanolamino panaudojimo) genus, iš kurių svarbiausi yra *eutB* ir *eutC* kurie kartu sudaro du etanolamino amoniako liazės subvienetus. EutBC skaido ETA į acetaldehido ir amoniako dujas, kurios yra atitinkamai anglies ir azoto šaltiniai. Etanolaminas leidžia prisitaikyti prie skirtingų šeimininkų aplinkos, tiksliai koordinuodamas genų, dalyvaujančių apdorojant ETA kaip maistinę medžiagą, ekspresiją, o kai kuriose sistemose ir virulentiškumo genus (Kaval and Garsin, 2018).

Etanolaminas yra plačiai paplitęs žinduolių ir bakterijų ląstelių membranose, kur jis yra fosfolipidų, tokių kaip fosfatidiletanolaminas, sudedamoji dalis. Fosfatidiletanolaminas (PE) sudaro 25–45 % visų

ląstelėje esančių fosfolipidų ir yra svarbus substratas bei pirmtakas keliuose biologiniuose keliuose (Vance and Tasseva, 2013). Fosfatidiletanolaminas, kaip pagrindinis bakterijų fosfolipidas, atlieka svarbų vaidmenį išsklaidant neigiamą krūvį, kurį sukelia anijoninių membranų fosfolipidai. Fosfatidiletanolaminas, veikdamas kaip šaperonas, prisideda prie tinkamo transporterių veikimo ir padeda membranos baltymams tinkamai susilankstyti (Krysenko *et al.*, 2019). PE yra daugiafunkcis fosfolipidas, reikalingas žinduolių vystymuisi ir yra būtinas įvairiems ląstelių procesams. PE yra antras pagal gausumą glicerofosfolipidas eukariotinėse ląstelėse. PE metabolizmo svarba žinduolių sveikatai neseniai išryškėjo po to, kai jis siejamas su Alzheimerio, Parkinsono ligomis, nealkoholine kepenų liga ir tam tikrų patogeninių organizmų virulentiškumu (Calzada *et al.*, 2016). Fosfolipidai slopina CWD prionų sėklų amiloido susidarymą. Ištyrus fosfolipidų potencialą sukelti arba slopinti prionais pasėto amiloido susidarymą RT-QuIC, į CWD⁺ arba CWD⁻ etanoliumi nusodintas smegenis naudojant 1 % komerciškai paruošto PE, fosfatidilcholino (PC) ir fosfatidilinozitolio (PI) tirpalus, buvo įrodyta, kad visi trys fosfolipidai slopino prionų sėklų amiloido susidarymą esant 10⁻¹ praskiedimui, o praskiedimas iki 10⁻³ atkūrė konversijos reakciją (Hoover *et al.*, 2017).

Atliktame tyrime (Uchiyama *et al.*, 2021) buvo pastebėta, kad pelių neuroblastomos N2a ląstelės, nuolat užkrėstos 22L skrepi ligos prionais, vadinamos N2aC24L1-3 ląstelėmis, sumažino PrP^{Sc} lygį, kai buvo auginamos pažangioje Dulbecco modifikuotoje erelio terpėje (DMEM) papildytoje etanolaminu. PrP^C lygis išliko nepakitęs prionais neužkrėstose pirminėse N2aC24 ląstelėse, kultivuotose pažangioje DMEM. Visi klasikiniai DMEM su etanolamino papildymu sumažino PrP^{Sc} kiekį N2aC24L1-3 ląstelėse. Priešingai, tik klasikinis DMEM be etanolamino papildymo nesugebėjo sumažinti PrP^{Sc} lygio N2aC24L1-3 ląstelėse. Šie rezultatai rodo, kad etanolaminas yra anti-prioninis junginys, įtrauktas į pažangią DMEM. Taip pat buvo įrodyta, kad etanolaminas yra veiksmingas prieš prionų infekciją *in vivo*, atitolindamas prionų ligą RML skrepi prionais infekuotose pelėse, priklausomai nuo jo vartojimo laiko. Trumpai tariant, yra nustatyta, kad etanolaminas yra naujas anti-prioninis junginys, galintis sumažinti PrP^{Sc} kiekį prionais užkrėstose ląstelėse ir atitolinti prionų ligą prionais infekuotose pelėse. Todėl etanolamino anti-prioninio aktyvumo mechanizmo išaiškinimas gali būti naudingas ne tik norint suprasti PrP^C konversijos į PrP^{Sc} mechanizmą, bet ir kuriant gydymo strategijas nuo prionų ligų.

1.3.1. Dietanolaminas ir trietanolaminas

Dietanolaminas (DEA) yra organinis junginys, kurio formulė HN(CH₂CH₂OH)₂ (1 priedas – 1.1 lentelė), yra antrinis aminas ir diolis. Savo struktūra panašus į MEA, tačiau turi dvi hidroksilo grupes ir vieną amino grupę. Kaip ir kiti organiniai aminai, dietanolaminas veikia kaip silpna bazė. Yra plačiai

naudojamas daugelyje plataus vartojimo prekių (kosmetikos preparatų ir vaistų), taip pat įvairiuose pramoniniuose procesuose: dujų ir vandens valyme, medžio ir metalo apdirbime. Cheminiuose procesuose dietanolaminas naudojamas gaminant dietanolamidus ir dietanolamino druskas, ilgos grandinės riebalų rūgštis, kurios vėliau naudojamos muilui ir paviršinio aktyvumo medžiagoms indų plovimo skysčiuose ir plovikliuose (Craciunescu *et al.*, 2006). Vandeniniai alkanolamino tirpikliai, tokie kaip dietanolaminas (DEA) ir metilo DEA (MDEA), yra naudojami kaip pramoniniai cheminiai absorbentai plovimo įrenginiuose. Vandeniniai MDEA ir DEA tirpalai plačiai naudojami pramoniniam apdorojimui, ypač rūgščių dujų srautams, kuriuose yra H_2S ir CO_2 (Ibrahim, Ashour and Gadalla, 2021). Nors DEA nėra laikomas konkerogeniškas žmonėms, tačiau yra įrodymų, kurie patvirtina kancereginiškumą su eksperimentiniais gyvūnais. Nacionalinės toksikologijos programos (NTP) ilgalaikiai toksiškumo tyrimai parodė, kad visą gyvenimą trunkantis DEA poveikis per odą padidino pelių, bet ne žiurkių, kepenų navikų dažnį (Leung *et al.*, 2005). Įrodyta, kad DEA sutrikdo pagrindinį cholino sintezės kelią ląstelėse, nes fosfatidiletanolamino sintezėje išstumia etanolaminą, ir trukdo cholino įsisavinimui per ląstelės membraną (Barbee and Hartung, 1979).

Trietanolaminas (TEA) yra amino alkoholis, komerciškai gaminamas aminuojant etileno oksidą su amoniaku. TEA yra reaktyvi ir bifunkcinė, derinanti alkoholių ir aminų savybes. TEA gali veikti kaip antioksidantas prieš gyvulinės ir augalinės kilmės riebalų autooksidaciją. Trietanolaminas plačiai naudojamas kosmetikoje, veikia kaip aktyviosios paviršiaus medžiagos arba pH reguliatorius. TEA naudojama gaminant emulsiklius ir disperguojančias medžiagas, skirtas tekstilės gaminiams, žemės ūkio chemikalams, vaškam, mineraliniams ir augaliniams aliejams, parafinui, poliravimo priemonėms, pjovimo alyvoms, naftos demulsifikatoriams ir cemento priedams (Fiume *et al.*, 2013). Nacionalinis vėžio instituto inicijuotame tyrime, įrodyta, kad TEA, kaip ir DEA, gali slopinti cholino pasisavinimą gydytų pelių kepenyse, todėl atsiranda cholino trūkumas ir panašus naviko susidarymo būdas kaip ir DEA (Stott, 2004).

Joninių skysčių trietanolamino acetato $[TEA][HOAc]$ ir dietanolamino chlorido $[HDEA][Cl]$ junginiai pasižymi nedideliu antibakteriniu aktyvumu. Įvertinus etanolamino kompleksų antimikrobinį aktyvumą, tirti junginiai parodė gerus priešgrybelinio aktyvumo rezultatus. *Aspergillus* rūšys buvo ypač jautrios dietanolamono-tetrachloridopalađatas (II) $[HDEA]_2[PdCl_4]$ kompleksui (Petrović *et al.*, 2012). Prionai yra labai atsparūs įprastiems sterilizavimo būdams ir gali išgyventi aplinkoje ilgą laiką. Todėl svarbu ištirti galimas įvairių junginių, įskaitant dietanolaminą ir trietanolaminą, anti-prionines savybes. Be to, verta paminėti, kad dietanolaminas, kaip ir trietanolaminas, plačiai naudojamas įvairiuose pramonės ir vartojimo produktuose, įskaitant kosmetiką, ploviklius ir vaistus. Todėl atliekant bet koki

dietanolamino antiprioninių savybių tyrimą taip pat reikėtų atsižvelgti į galimą riziką, susijusią su šio junginio poveikiu, toksiškumu.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

- Adeninas (Roth, JAV)
- Etanolaminas (Carl Roth, Vokietija)
- Dietanolaminas (Carl Roth, Vokietija)
- L-histidinas (MilliporeSigma, JAV)
- L-leucinas (Serva, Vokietija)
- L-triptofanas, uracilas, mielių ekstraktas, YNB (be aminorūgščių), agaras, peptonas, D(+)-gliukozės monohidratas, imersinis aliejus (Carl Roth, Vokietija)
- Trietanolaminas (LaborTeknik, Turkija)

2.1.2. Prietaisai

- Autoklavas (Systec, VX-150)
- Biofotometras (Eppendorf)
- Elektrinės svarstyklės (Kern ADB)
- Laminarinis boksas (Thermo Scientific/Mars)
- Mikroskopas (Olympus)
- Plokštelių skaitytuvas „Varioskan Flash“ (Thermo Scientific)
- PVDF membranos filtras (Carl Roth, Vokietija)
- Purtytuvas (VELP scientifica)
- Termostatas (WR/Binder)

2.1.3. Kultivavimo terpės

Darbe naudotos mitybinės terpės ir jų sudėtis yra vaizduojamos 1.1 lentelėje. Ruošiant terpės buvo naudotas dejonizuotas vanduo, sterilinama autoklavuojant 0,8 atm sąlygomis. Terpės sudėtis nurodyta 1 L vandens.

2.1 lentelė. Mielių auginimui naudotos terpės ir jų priedai.

Terpė	Terpės sudėtis
YPD	Gliukozė 20 g
	Peptonas 20 g
	Mielų ekstraktas 10 g
	Agaras 20 g
SC	Gliukozė 20 g
	YNB 6,7 g
	Agaras 20 g
SC terpės priedai	Leucino tirpalas 20 mL
	Uracilo tirpalas 10 mL
	Adenino tirpalas 15 mL
	Histidino tirpalas 3 mL
	Triptofano tirpalas 10 mL

2.1.4. Tirpalai

Darbe naudoti tirpalai, jų sudėtis ir sterilinimo būdas yra nurodyti 2.2 lentelėje. Terpės sudėtis nurodyta 1 L vandens.

2.2 lentelė. Kultivavimo terpėms naudojamų priedų tirpalai.

Tirpalas	Tirpalo sudėtis	Sterilinimo būdas
Leucino tirpalas	L-leucinas 13,1 g	Sterilinamas autoklavuojant
Uracilo tirpalas	Uracilas 22,4 g	Sterilinamas filtruojant/autoklavuojant
Adenino tirpalas	Adeninas 13,5 g	Sterilinamas filtruojant/autoklavuojant
Triptofano tirpalas	L-triptofanas 8 g	Sterilinamas filtruojant
Histidino tirpalas	L-histidinas 20,9 g	Sterilinamas filtruojant/autoklavuojant

2.2. Metodai

2.2.1. Tyrimo objektas

Darbe yra naudojami auksotrofinių mutacijų turintys *S. cerevisiae* 74D-694 (MATa *ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 ura3-52 leu2-3,112*) [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S kamienai, kurie yra laikomi „Mikrobiologijos ir biotechnologijų katedros“ muziejuje. Visiems naudojamiems kamienams yra būdingos 5 mutacijos biosintetiniuose genuose, kurie yra atsakingi už aminorūgščių arba nukleotidų biosintezę (Chernoff *et al.*, 1993):

- 1) *ade1-14* – *nonsense* (priešlaikinio baigtinio kodono) mutacija: TGG (*trp*) → TGA (baigties kodonas), *ADE1* geno 244 pozicijoje.
- 2) *trp1-289* – *nonsens* mutacija (CAG (*gln*) → TAG (baigties kodonas) *TRP1* geno 403 pozicijoje.
- 3) *his3-Δ200* – 1036 bazių porų dydžio delecija *HIS3* gene ir dvikrypčiame *MRM1* (PET56) geno promotoriuje.
- 4) *ura3-52* – mielių transpozono Ty1 insercija *URA3* gene.
- 5) *leu2-3,112* – dvigubas mutantas: *leu2-3* ir *leu2-112*. Abi mutacijos – skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos *LEU2* gene.

2.2.2. Ląstelių paruošimas

Pernešant ląsteles iš vienos terpės į kitą, naudojamas mikrobiologinis klonavimas. Šio metodo tikslas yra išlaikyti sterilią aplinką viso proceso metu, siekiant užtikrinti kultūros vientisumą ir užkirsti kelią nepageidaujamam mikrobų augimui.

Eksperimente naudojamos *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelės, kurios laikomos labai žemoje temperatūroje (-70 °C), yra perkeliamos į standartinę kietą YPD terpę ir yra auginamos 30 °C temperatūroje 3 dienas. Po to ląstelės persėjamos brūkšneliais ant naujos kietos YPD terpės. Po dar 3 dienų yra atliekamas mikrobiologinis antspaudavimas, kuris yra būtinas norint įsitikinti ar ląstelėse neįvyko mutacijų. Antspaudavimui naudojamos terpės be tam tikrų amino- ir nukleorūgščių (neigiama kontrolė, kurioje nenaudojama nei viena amino-, nukleorūgštis – SC⁻), teigiamoje kontrolėje – SC⁺ naudojamos visos būtinos amino- ir nukleorūgštys. Taip pat yra naudojamos terpės be vienos amino- arba nukleorūgšties (SC^{-leu}, SC^{-ura}, SC^{-ade}, SC^{-his}, SC^{-trp}). Ant sintetinių terpių ląstelės auginamos 5 dienas. Jei [*psi*⁻] ląstelės neauga niekur, išskyrus ant teigiamos kontrolės, o [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelės tik ant teigiamos kontrolės ir terpėje be adenino (SC^{-ade}), ląstelių kolonijos yra persėjamos ant kietų YPD

terpių ir naudojamos tolesniuose eksperimentuose.

2.2.3. Mikroplokštelių praskiedimo metodas

Mikroplokštelių praskiedimo metodas naudotas ląstelių augimo ir prionizacijos su skirtingomis etanolaminų koncentracijomis stebėjimams atlikti. Ląstelės yra klonuojamos mikrobiologiškai ant kieto YPD terpės paviršiaus ir auginamos 30 °C temperatūroje.

Toliau atliekant *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimo dinamikos stebėjimus ląstelės yra persėjamos į skystas SC terpes su visomis būtinomis amino- ir nukleorūgštimis (Leu, Ura, Ade, His, Trp). Paruošiamos ląstelių kultūros SC terpėse, kurių optinis tankis (OT₆₀₀) 0,12. Norint paruošti tirpalus su etanolaminų skirtingomis koncentracijomis, jie yra maišomi su distiliuotu vandeniu (dH₂O) ir skysta SC terpe su ląstelėmis, kad galutinės koncentracijos būtų: 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,3 mg/mL arba 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL, 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL ir 3 mg/mL. Tokios koncentracijos pasirinktos remiantis joninių skysčių trietanolamino acetato ir dietanolamino chlorido antimikrobinėmis savybėmis (Petrović *et al.*, 2012), literatūroje aprašomas antimikrobinis aktyvumas nuo 0,25 mg/ml trietanolamino tirpalo koncentracijos. Taip pat yra paruošiama neigiama ir teigiama kontrolė, kuriose dH₂O maišoma su skysta SC terpe be ląstelių (neigiama kontrolė) arba su skysta SC terpe su ląstelėmis (teigiama kontrolė). Ląstelių kultūros ir trietanolaminas yra maišomi santykiu 1:1, dėl to galutinis ląstelių OT₆₀₀ yra 0,06. Mėginiai su ląstelėmis auginami 96 šulinėlių, plokščiu dugnu (angl. *F-bottom*), polistireninėse mikroplokštelėse. Auginant ląsteles 48 val. optinio tankio matavimai atliekami kas 3 val. (daromi persidengiantys matavimai – 12 val. paslinktos kreivės). Prieš kiekvieną matavimą ląstelės yra resuspenduojamos daugiakanale pipete.

Stebinti *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelių prionizaciją, kaip ir ankstesniu atveju mikrobiologiškai klonuotos ląstelės yra persėjamos ir auginamos sintetinėje pilnoje terpėje be adenino (SC^{-ade}) su skirtingomis etanolaminų koncentracijomis. Optinio tankio matavimai vyksta 1–2 savaites, kas 12 val., iki pilnai įvyksta kontrolinių (0 mg/mL) mėginių prionizacija. Kas 2 dienas, lašiukas kiekvienos suspensijos užlašinamas ant YPD kietos terpės, tikrinama ar nėra užkrato ir ar ląstelės nepakeitė *PSI* fenotipo.

2.2.4. Ląstelių augimo ir prionizacijos kreivių sudarymas

Ląstelių augimas ir prionizacija yra stebimi naudojant „Varioskan Flash“ plokštelių skaitytuvą. Gauti rezultatai yra apdorojami naudojant GraphPad *Prism9* programą, kurioje braižomi grafikai, atvaizduojantys augimo bei prionizacijos eigą.

2.2.5 Kultūrų grynumo tikrinimas

Atliekant augimo stebėjimus, kiekvienos dienos pabaigoje lašiukas kiekvienos suspensijos užlašinamas ant kietos YPD terpės. Ląstelės su skirtingomis trietanolamino koncentracijos auginamos 48 val. kietose YPD terpėse siekiant ištirti ar nėra užkrato ir ar ląstelės nepakeitė *PSI* fenotipo. Tiriant etanolaminų įtaką prionizacijai, ląstelės buvo išsėjamos ant kietos YPD terpės kas 2 dienas, siekiant stebėti kokios ląstelės auga ir kokias kolonijas formuoja. Ant kietų terpių užaugus neįprastos morfologijos kolonijoms, duomenys buvo laikomi nepatikimais ir sudarinėjant augimo kreives nenaudojami. Taip pat, ląstelės augusios kietose YPD terpėse buvo tirtos mikroskopu, naudojant aliejaus-imersinį objektyvą 1000× padidiniu.

2.2.6. Statistinė analizė

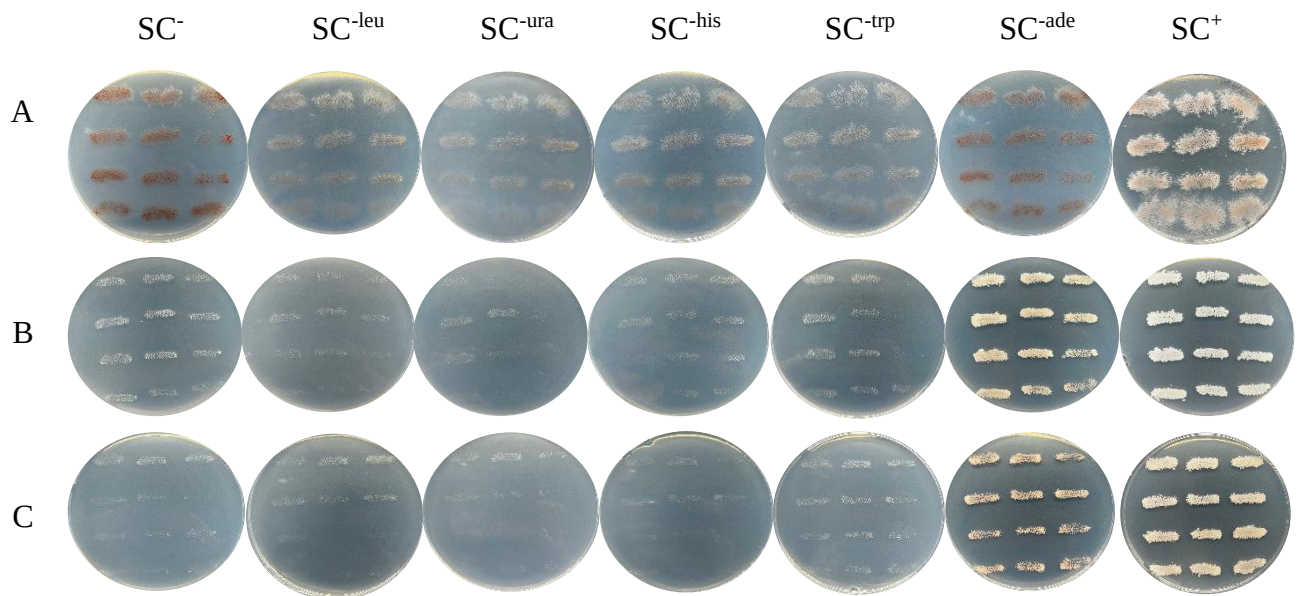
Visiems bandymams buvo atlikti bent 3 pakartojimai. Statistinė analizė pasitelkta visiems rezultatams.

ANOVA dispersinė analizė atlikta lyginant skirtumus tarp rezultatų ir tikrinant ar gauti rezultatai yra statistiškai reikšmingi ($\alpha = 0,05$).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Ląstelių paruošimas

Po mikrobiologinio antspaudavimo ant sintetinių terpių, buvo nustatyta, jog kultivuotų ląstelių genotipai yra tinkami tolesniems tyrimams atlikti. Kamienų ląstelės, turinčios auktotrofines mutacijas (MATa *ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 ura3-52 leu2-3,112*) ir naudotos šiame darbe, negali augti ant terpės, kurioje nėra reikalingų priedų. [*psi*⁻] kamieno ląstelėms augti SC terpėje yra reikalingas uracilas, triptofanas, histidinas, adeninas ir leucinas, o [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S gali augti ir terpėje, kurioje trūksta adenino (3.1 pav. – SC⁺, SC^{-ade}). Remiantis ląstelių augimu ant sintetinių terpių be tam tikrų amino- arba nukleorūgščių, buvo padaryta išvada, kad ląstelėse genetinių mutacijų neįvyko ir naudoti kamienai yra tinkami naudoti tolimesniuose darbuose (3.1 pav).



3.1 pav. *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimas kietose sintetinėse terpėse. A – [*psi*⁻] varianto ląstelės, B – [*PSI*⁺]^W ląstelės, C – [*PSI*⁺]^S ląstelės. SC⁻ - neigiamą kontrolę, terpė be amino- ir nukleorūgščių, SC^{-leu}, SC^{-ura}, SC^{-his}, SC^{-trp}, SC^{-ade} – terpės be atitinkamos amino- arba nukleorūgšties, SC⁺ - teigiama kontrolė, terpė su naudotomis amino- ir nukleorūgštimis.

3.1 pav. yra vaizduojamos sintetinės terpės, kuriose tik teigiamoje kontrolėje (SC⁺) pastebėtas visų darbe naudotų kamienų ląstelių augimas. Terpėje be adenino (SC^{-ade}) augo tik [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S kamienų ląstelės ([*psi*⁻] kamieno ląstelių augimas nepastebėtas). Neigiamoje kontrolėje (SC⁻) ir terpėse be leucino, uracilo, histidino ar triptofano ląstelės neaugo (SC terpėse yra matomos žymės, nes po mikrobiologinio antspaudavimo liko ląstelių pėdsakai, tačiau ląstelių augimas nepastebėtas, jį slopino atitinkamų amino- arba nukleorūgščių trūkumas terpėje).

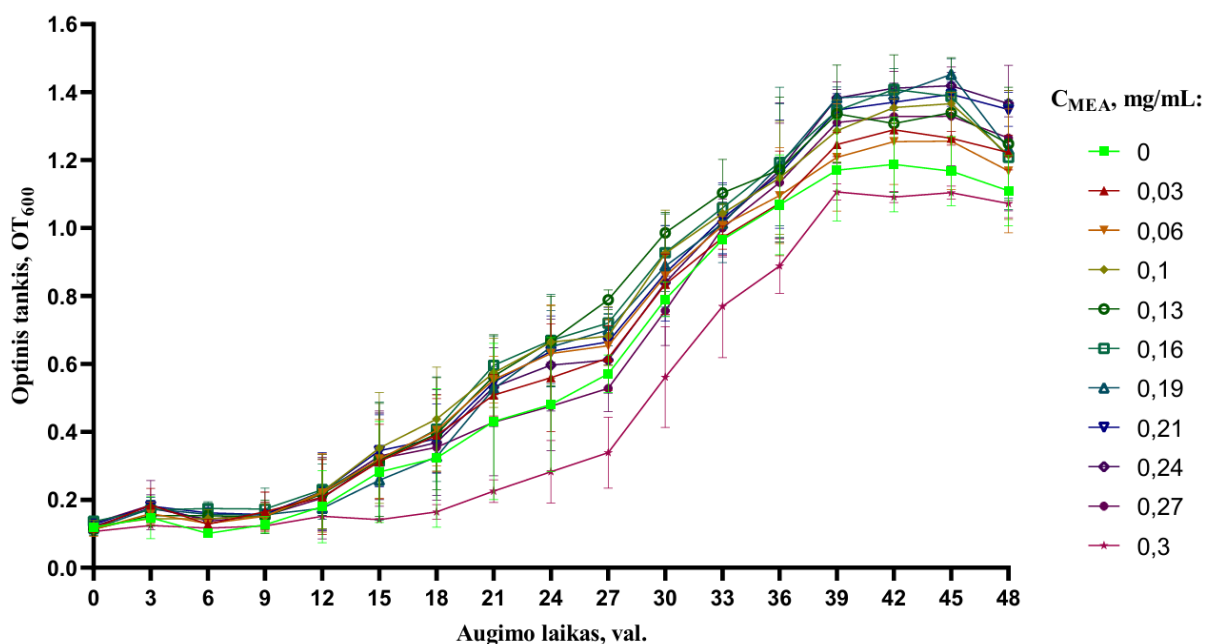
3.2. *S. cerevisiae* 74D-694 kamieno ląstelių augimas su skirtingomis etanolaminų koncentracijomis

Šis etapas yra svarbus norint sužinoti ar tirta medžiaga nepažeidžia *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimo procesą ir yra būtinas žingsnis norint tęsti tolesnius darbus, nustatant ar etanolaminai stabdo / slopina / skatina prionų susidarymą *S. cerevisiae* ląstelėse. Atliekant ląstelių augimo stebėjimus su didesnėmis monoetanolamino, dietanolamino ir trietanolamino koncentracijomis, buvo pastebėta, kad ląstelės neaugo arba jų augimas buvo slopinamas visose terpėse su 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL, 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL monoetanolamino ir dietanolamino tirpalų koncentracijomis (2 priedas – 2.1–2.6 pav.). Statistinė analizė patvirtino, kad mėginiai su šiomis koncentracijomis augo statistiškai reikšmingai prasčiau lyginant su kontrolėje augusiomis ląstelėmis ($p < 0,05$). Buvo nustatyta, kad MEA 0,32 mg/mL ir didesnė koncentracija daro statistiškai reikšmingą įtaką [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui, o [*psi*⁻] ląstelėms nuo 0,63 mg/mL. DEA didžiausia koncentracija nedariusi įtakos [*PSI*⁺]^S ir [*psi*⁻] ląstelėms – 0,63 mg/mL, o [*PSI*⁺]^W ląstelėms įtaką daro nuo 0,32 mg/mL. Todėl buvo kartojamas ląstelių augimo stebėjimas su mažesnėmis monoetanolamino ir dietanolamino koncentracijomis.

3.2.1. Monoetanolamino poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui

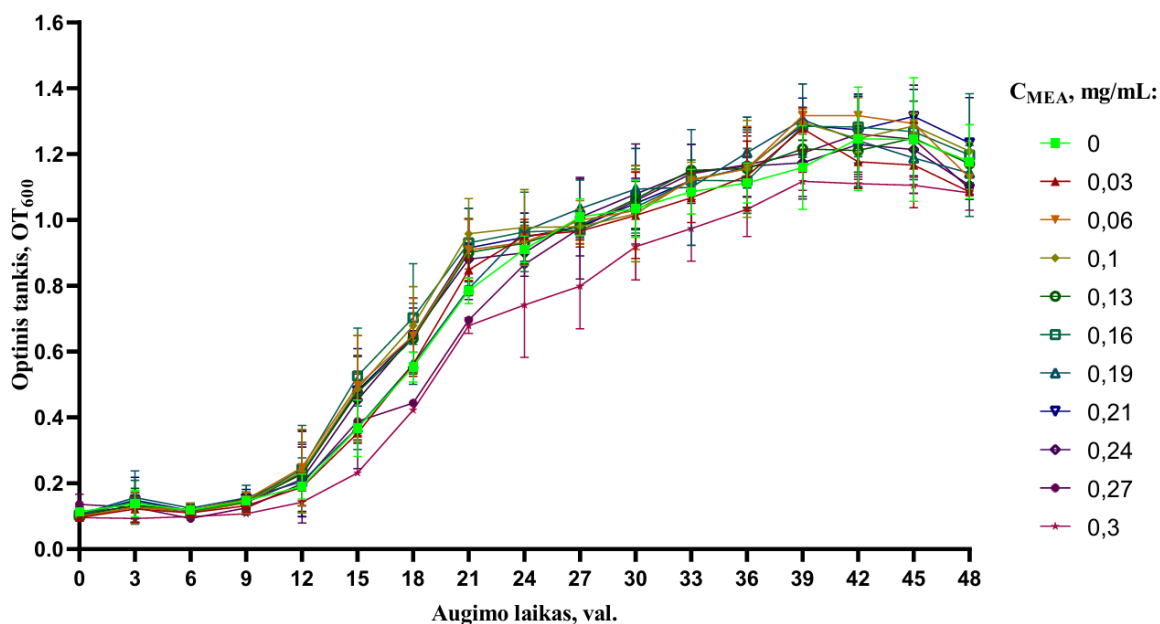
Atlikus *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimo stebėjimus, terpėje esant atitinkamai 0 mg/mL (kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis), 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL koncentracijomis, nebuvo pastebėta, kad MEA trukdytų ląstelių augimui (3.2, 3.3, 3.4 pav.).

Pateiktoje [*psi*⁻] ląstelių augimo kreivėje (3.2 pav.) galima pastebėti, kad tiek kontrolėje (0 mg/mL – kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis) tiek mėginiuose su skirtingomis MEA koncentracijomis (0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,3 mg/mL) mielių ląstelės augo panašiai. Šių mėginių (išskyrus mėginį su didžiausia 0,3 mg/mL MEA koncentracija) aktyvus ląstelių dalijimasis fiksuotas nuo 12 val. iki 39 val., toliau pereinant į stacionarią augimo fazę. Ląstelėms augusioms su 0,3 mg/mL tiriamosios medžiagos lėmė lėtesnį augimą, eksponentinis augimas pastebimas nuo 18 matavimo valandos. ANOVA dispersinės analizės pagalba buvo tikrinami ar skirtumai tarp kontrolėje augusių ląstelių optinio tankio vidurkių ir mėginių su atitinkama MEA koncentracija yra statistiškai reikšmingi. Buvo nustatyta, kad visuose mėginiuose skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi ($p \geq 0,05$).



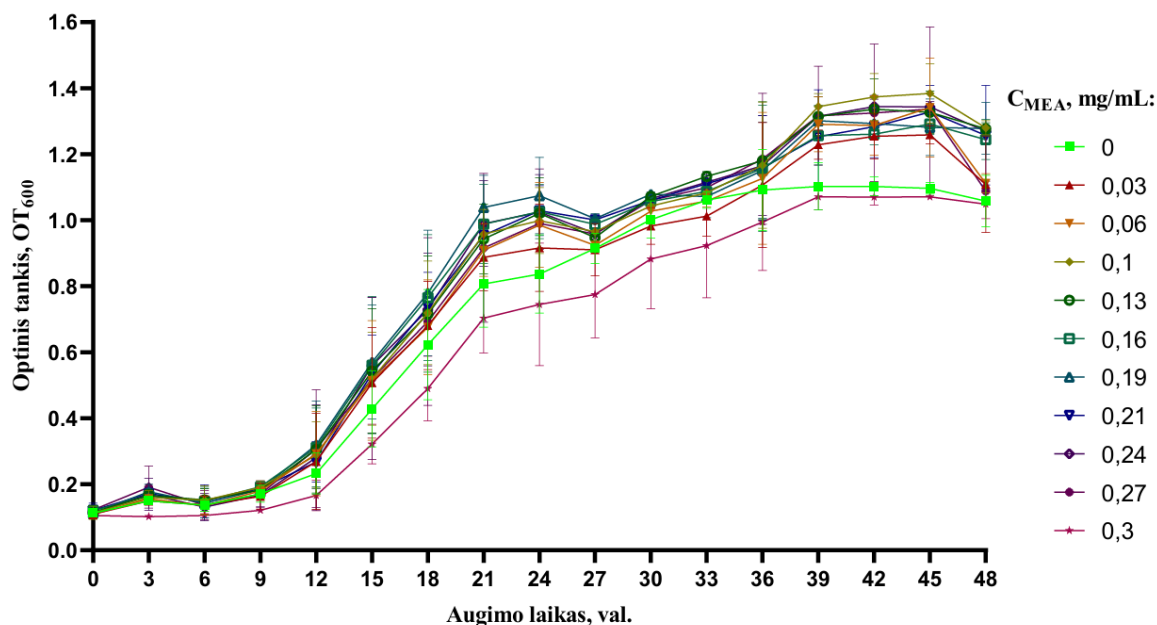
3.2 pav. Monoetanolamino (MEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelių augimui SC⁺ terpėje.
Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Mėginiuose su [*PSI*⁺]^W ląstelėmis nustatyta, kad visuose mėginiuose augusios ląstelės eksponentiškai dalijosi iki 39–42 val., tai vaizduoja sudaryta augimo kreivė (3.3 pav.). Kreivėje matyti, kad skirtingos MEA koncentracijos neturėjo įtakos ląstelių augimui. Tai patvirtina statistinė analizė, kurios metu nustatyta, jog kontrolinio mėginio ir mėginių su skirtingos koncentracijos tiriamąja medžiaga skirtumai nėra reikšmingi ($p \geq 0,05$).



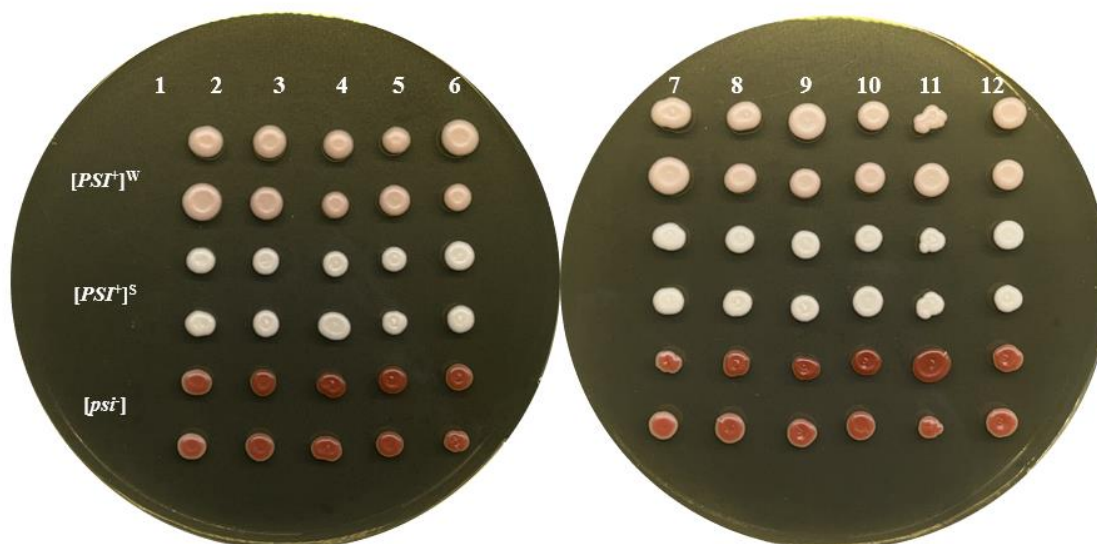
3.3 pav. Monoetanolamino (MEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W ląstelių augimui SC⁺ terpėje.
Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Stebint kitų ląstelių – $[PSI^+]^S$ – augimą su skirtingomis MEA koncentracijomis, taip pat buvo sudaryta augimo kreivė (3.4 pav.). Kaip ir kontroliniame mėginyje (0 mg/mL – kontrolė su vandeniu ir skysta terpė su ląstelėmis), taip ir mėginiuose su 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,3 mg/mL MEA koncentracija augusios ląstelės stacionarią augimo fazę pasiekė apie 39 val. Palyginus mėginių optinio tankio vidurkius tarpusavyje, nustatyta, kad statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo ($p \geq 0,05$).



3.4 pav. Monoetanolamino (MEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 $[PSI^+]^S$ ląstelių augimui SC^+ terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkliai $\pm$ paklaida.

Atlikus tyrimą, ląstelės buvo išsėtos ant mitybinės YPD terpės, siekiant patikrinti kultūros grynumą (3.5 pav.). Pagal suformuotas mielių kolonijas galima teigti, kad mėginiuose augo tik *S. cerevisiae* 74D-694 $[psi^-]$, $[PSI^+]^W$ ir $[PSI^+]^S$ ląstelės, todėl stebėtos kultūros buvo gynos.

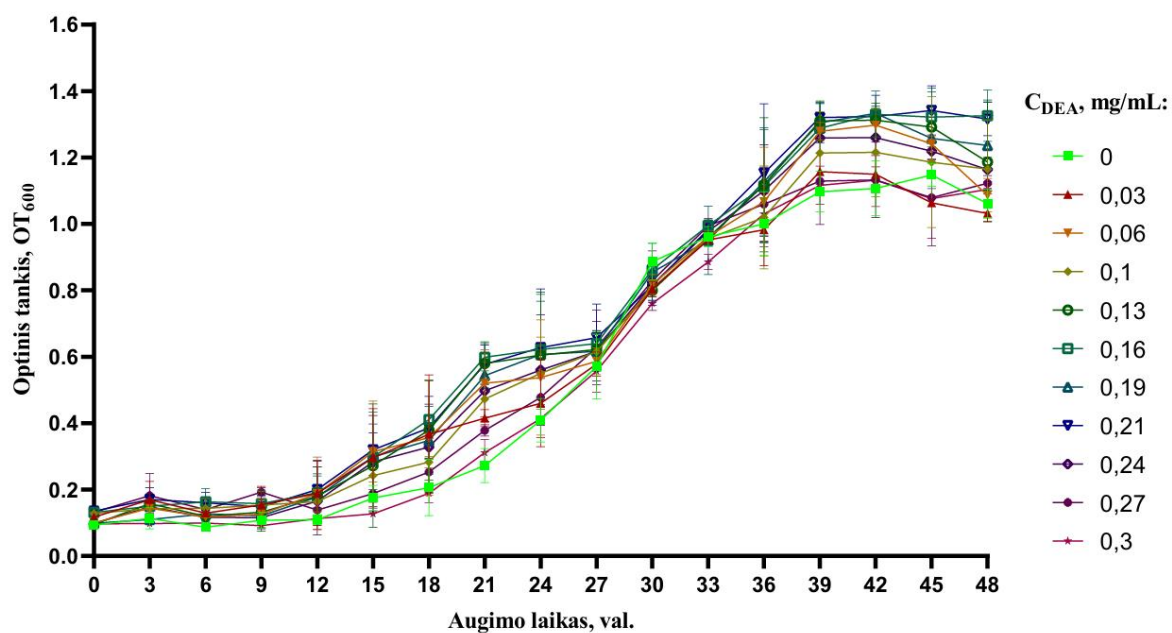


3.5 pav. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 $[PSI^+]^W$, $[PSI^+]^S$ ir $[psi^-]$ ląstelės išsėtos ant kietos YPD terpės su skirtingomis monoetanolamino (MEA) koncentracijomis. 1 stulpelis – švaros kontrolė (be ląstelių), 2 – 0 mg/mL, 3 – 0,03 mg/mL, 4 – 0,06 mg/mL, 5 – 0,1 mg/mL, 6 – 0,13 mg/mL, 7 – 0,16 mg/mL, 8 – 0,19 mg/mL, 9 – 0,19 mg/mL, 10 – 0,24 mg/mL, 11 – 0,27 mg/mL, 12 – 0,3 mg/mL.

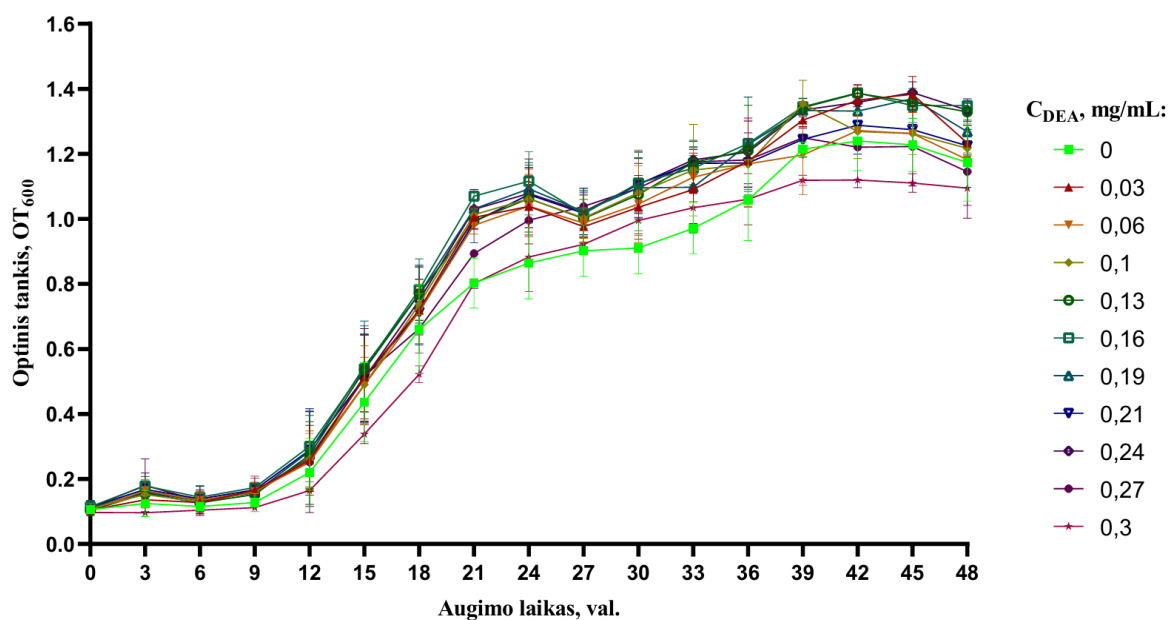
Taigi, galima teigti, kad pasirinktos MEA koncentracijos ląstelių augimui poveikio neturėjo. Tai patvirtina sudarytos ląstelių augimo kreivės (3.2, 3.3, 3.4 pav.) ir ant kietos YPD terpės suformuotos kolonijos (3.5 pav.). Taip pat, lyginant mėginius tarpusavyje galima pastebėti, kad tiek kontroliniuose mėginiuose, tiek mėginiuose su skirtingomis MEA koncentracijomis augusios $[psi^-]$, $[PSI^+]^W$ ir $[PSI^+]^S$ ląstelės augo panašiu greičiu ir aktyviai dalijosi apie 39 valandas. ANOVA analizė patvirtino statistiškai nereikšmingus skirtumus tarp kontrolės ir mėginių su atitinkama MEA koncentracija.

3.2.2. Dietanolamino poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 $[psi^-]$, $[PSI^+]^W$ ir $[PSI^+]^S$ ląstelių augimui

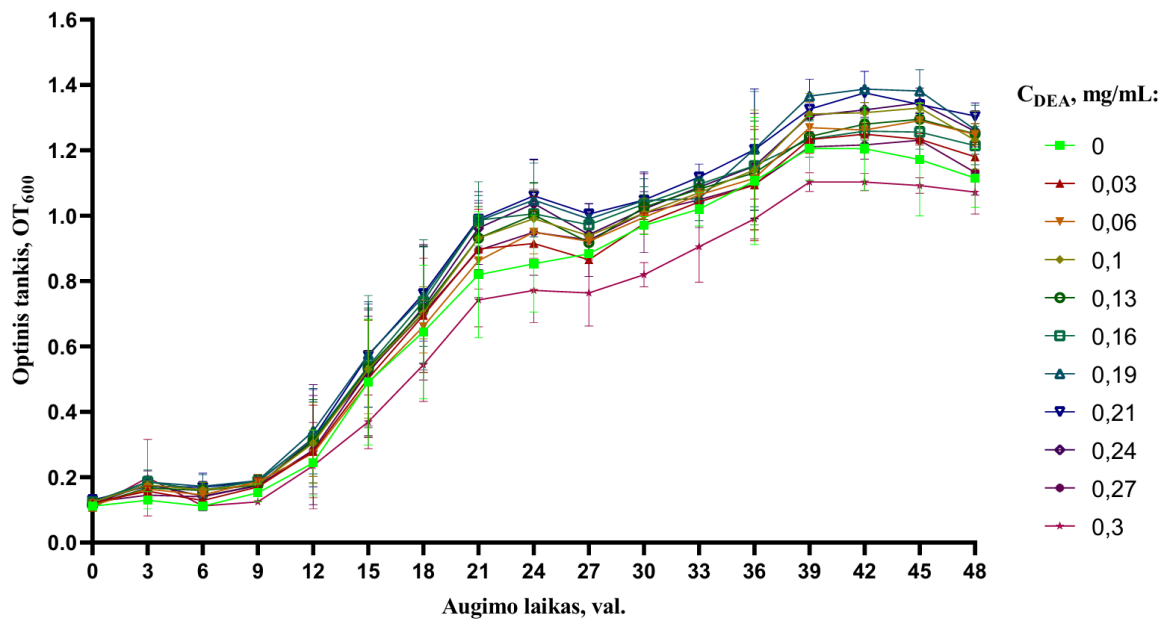
Siekiant išsiaiškinti DEA poveikį *S. cerevisiae* 74D-694 $[psi^-]$, $[PSI^+]^W$ ir $[PSI^+]^S$ ląstelių augimui buvo atliekami 48 val. matavimai. Pagal gautus rezultatus buvo sudarytos ląstelių augimo kreivės (3.6, 3.7, 3.8 pav.). Kaip ir tyrime su MEA, taip ir šiame tyrime buvo pastebėta, kad 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL koncentracija tiriamos medžiagos ląstelių augimui įtakos neturėjo, nes esant skirtingų koncentracijų DEA kiekvienu atveju matomas augimas yra panašus į kontroliniuose mėginiuose (0 mg/mL – kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis) augusių ląstelių augimą.



3.6 pav. Dietanolamino (DEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelių augimui SC⁺ terpėje.
Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

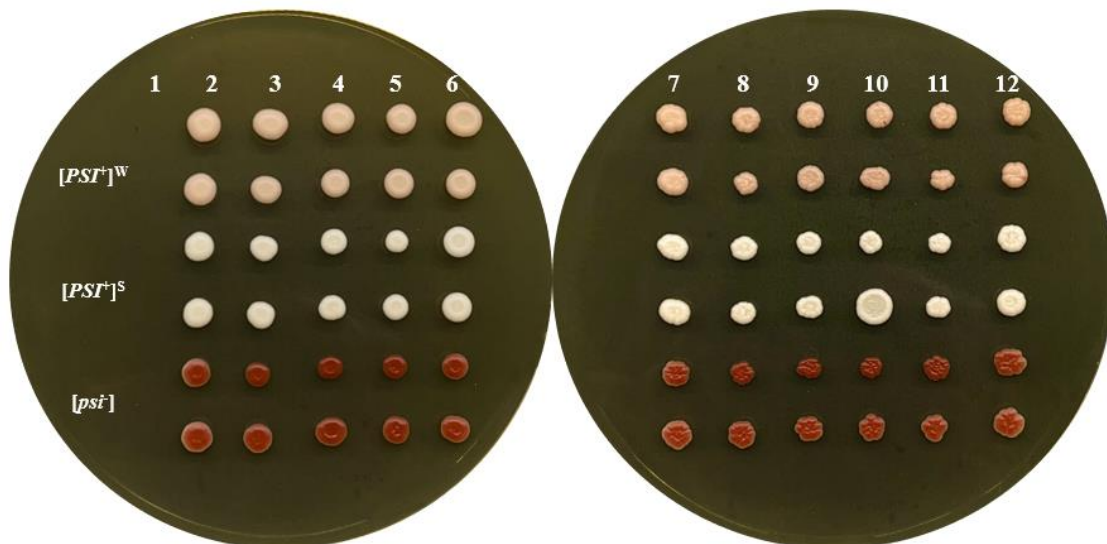


3.7 pav. Dietanolamino (DEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W ląstelių augimui SC⁺ terpėje.
Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.



3.8 pav. Dietanolamino (DEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui SC⁺ terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Po ląstelių auginimo su skirtingomis DEA koncentracijomis buvo tiriamas ir kultūros grynumas, kuris yra vaizduojamas 3.9 pav. Lyginant su kontroliniais mėginiais, kiekvieno mėginio ląstelės su tirama medžiaga suformavo panašias kolonijas. Galima teigti, kad nė viena DEA koncentracija ląstelių augimui poveikio nedarė ir kultūra buvo gryna.



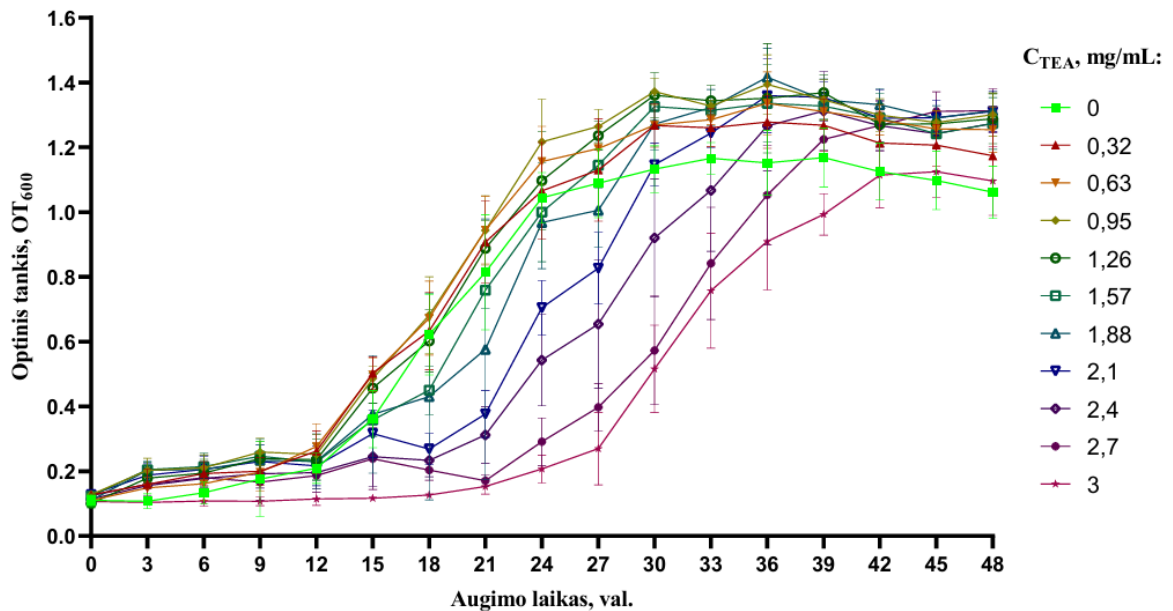
3.9 pav. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W, [*PSI*⁺]^S ir [*psi*⁻] ląstelės išsėtos ant kietos YPD terpės su skirtingomis dietanolamino (DEA) koncentracijomis. 1 stulpelis – švaros kontrolė (be ląstelių), 2 – 0 mg/mL, 3 – 0,03 mg/mL, 4 – 0,06 mg/mL, 5 – 0,1 mg/mL, 6 – 0,13 mg/mL, 7 – 0,16 mg/mL, 8 – 0,19 mg/mL, 9 – 0,19 mg/mL, 10 – 0,24 mg/mL, 11 – 0,27 mg/mL, 12 – 0,3 mg/mL

Eksperimento metu buvo nustatyta, kad pasirinktos DEA koncentracijos neturi įtakos *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui. Tiek kontroliniuose mėginiuose, tiek mėginiuose su skirtingomis DEA koncentracijomis ląstelės augo panašiai, aktyviai dalijosi nuo 9–12 val. iki 39 val., vėliau pereidamos į stacionarią augimo fazę. Pasitelkus ANOVA analizę, nustatyta, kad [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių optinio tankio vidurkių ir ląstelių augusių mėginiuose su 10 skirtingų DEA koncentracijų skirtumai nėra reikšmingi ($p \geq 0,05$).

3.2.3. Trietanolamino poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui

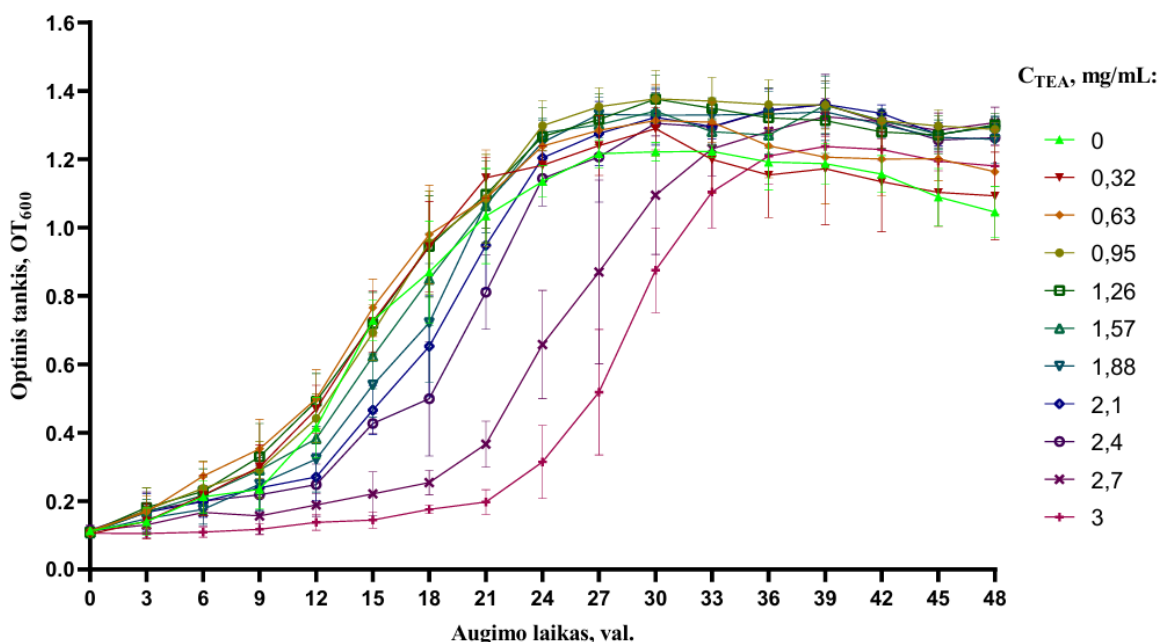
Atlikus ląstelių augimo stebėjimus, SC skystoje terpėje esant atitinkamoms koncentracijoms trietanolamino, 0 mg/mL (kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis), 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL, 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL buvo pastebėta, kad tiriamoji medžiaga priklausomai nuo koncentracijos slopina ląstelių augimą, tai patvirtina sudarytos augimo kreivės (3.10, 3.11, 3.12 pav.).

Kreivėje matyti (3.10 pav.), kad mažesnių (0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL) koncentracijų mėginiuose augusios [*psi*⁻] ląstelės panašiai augo kaip ir kontrolėje buvusios ląstelės. Šių mėginių eksponentinis ląstelių augimas fiksuotas iki 30 val., vėliau ląstelės pereina į stacionarią augimo fazę. Ląstelėms su tiriamąja medžiaga, 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL ir 3 mg/mL koncentracija lėmė lėtesnį augimą. 2,1 mg/mL ir 2,4 mg/mL koncentracijų mėginiuose ląstelės aktyviai dalijosi iki 36 val., 2,7 mg/mL stacionarią fazę ląstelės pasiekė 39 val., o 3 mg/mL – 42 augimo valandą. Atlikus ANOVA dispersinę analizę, skirtą tikrinti ar skirtumai tarp kontrolės ir mėginių optinio tankio vidurkių yra statistiškai reikšmingi, buvo pastebėta, kad lyginant teigiamos kontrolės skirtumus su mėginiais, kuriuose buvo trietanolaminas, gauta, kad mėginiuose su 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$), ląstelės auga statistiškai reikšmingai prasčiau nei be trietanolamino. Mėginiuose su 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL, 2,1 mg/mL – statistiškai nereikšmingi skirtumai ($p \geq 0,05$).



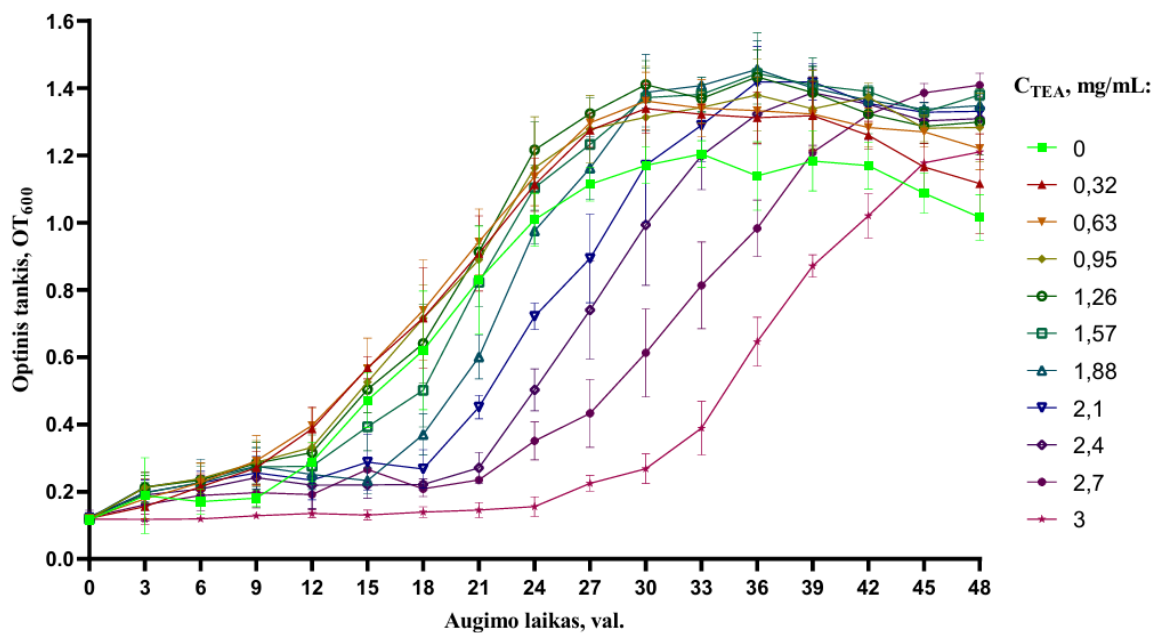
3.10 pav. Trietanolamino (TEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁺] ląstelių augimui SC⁺ terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Surinkti duomenys parodė, kad TEA turi įtakos ir [*PSI*⁺]^w ląstelių augimui. Remiantis sudaryta ląstelių augimo kreive (3.11 pav.) galima pastebėti, kad ląstelės su tiriamąja medžiaga stacionariąją augimo fazę pasiekė skirtingomis augimo valandomis. Teigiamoje kontrolėje ir mėginiuose su 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL, 2,1 mg/mL, 2,4 trietanolamino koncentracijomis, ląstelių augimas pradėjo lėtėti apie 27 augimo valandą, o mėginiuose, kuriose buvo 2,7 mg/mL ir 3 mg/mL tiriamos medžiagos, ląstelės aktyviai augo iki 36 valandos. Atliekant ANOVA analizę nustatyta, kad statistškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai yra tarp teigiamos kontrolės ir keturių skirtingų koncentracijų mėginių (2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL). Likusios tyrime naudotos koncentracijos statistškai reikšmingų skirtumų neturėjo.



3.11 pav. Trietanolamino (TEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W ląstelių augimui SC⁺ terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Taip pat buvo tirtas TEA poveikis [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui bei sudaryta augimo kreivė (3.12 pav.). Augimo kreivė vaizduoja, kad trietanolamo koncentracijos ląstelių augimui įtakos turėjo, nes priklausomai nuo terpėje esamų skirtingų koncentracijų junginiui matomas augimas atskiru atveju skyrėsi nuo teigiamoje kontrolėje augusių ląstelių augimo. Augimo kreivė rodo, kad mėginių su mažesnėmis TAE koncentracijomis augimas buvo panašus į teigiamosios kontrolės mėginį. Tiek kontrolinėje terpėje, tiek 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL koncentracijos mėginiuose, ląstelių aktyvus augimas vyko maždaug iki 30 val., o didesnių koncentracijų mėginiai augo kur kas lėčiau. Stacionarią ląstelių augimo fazę ląstelės su 2,1 mg/mL ir 2,4 mg/mL TEA koncentracija pasiekė 36 valandą, 2,7 mg/mL ir 3 mg/mL – 48 val. Atlikus ANOVA analizę, buvo nustatyta, kad 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL koncentracijų skirtumai yra statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) lyginant su kontrole. Mažesnėse koncentracijose augusių ląstelių skirtumai nėra statistiškai reikšmingi ($p \geq 0,05$).



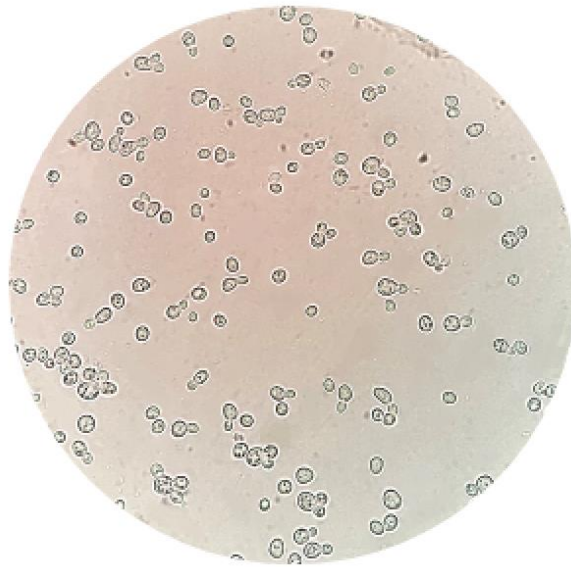
3.12 pav. Trietanolamino (TEA) poveikis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui SC⁺ terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Tam, kad būtų patikrinamas kultūrų grynumas, atliekant ląstelių augimo stebėjimus, ląstelės buvo išsėtos ant kietos YPD terpės ir auginamos 2 dienas (3.13 pav). Pagal pateiktą paveikslėlį, galima teigti, jog mėginiuose augo *S. cerevisiae* ląstelės ir suformuotos kolonijos atitinka *PSI* fenotipui būdingą morfologiją (Sherman, 2002).



3.13 pav. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W, [*PSI*⁺]^S ir [*psi*⁻] ląstelės išsėtos ant kietos YPD terpės su skirtingomis trietanolamino (TEA) koncentracijomis. 1 stulpelis – švaros kontrolė (be ląstelių), 2 – 0 mg/mL, 3 – 0,32 mg/mL, 4 – 0,63 mg/mL, 5 – 0,95 mg/mL, 6 – 1,26 mg/mL, 7 – 1,57 mg/mL, 8 – 1,88 mg/mL, 9 – 2,1 mg/mL, 10 – 2,4 mg/mL, 11 – 2,7 mg/mL, 12 – 3 mg/mL.

Šviesiniu mikroskopu dar kartą patvirtintas augintų ląstelių kultūrų grynumas (3.14 pav.). Mikroskopuojamos ląstelės atitiko mielių *S. cerevisiae* būdingą morfologiją, paveiksle vaizduojamos ląstelės yra ovalios formos (Sherman, 2002) ir nebuvo pastebėta jokių *S. cerevisiae* ląstelių struktūrą neatitinkančių svetimų ląstelių, todėl priimta išvada, kad kultūrų formuojamos kolonijos buvo tikrai grynos.



3.14 pav. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelės pro šviesinio mikroskopo vaizdą 1000x padidiniu.

Taigi, eksperimento metu nustatyta, kad trietanolaminas turi įtakos *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui. Ląstelės su didesne trietanolamino koncentracija (2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL) auga prasčiau nei be jo, o su mažesne koncentracija skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Tai parodo, kad naudotuose mėginiuose augusioms ląstelėms, bandymo metu sukurtos aplinkos sąlygos visgi turėjo įtakos. ANOVA analizė patvirtino statistiškai reikšmingus skirtumus tarp teigiamos kontrolės ir mėginių su didesne trietanolamino koncentracija.

Lyginant visus tyrime naudotus mėginius tarpusavyje, pastebima tendencija, kad visų tirtų TEA koncentracijų įtaka *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S variantų ląstelėms buvo panaši. Mažiausias skirtumas tarp teigiamoje kontrolėje augusių ląstelių ir tarp ląstelių augusių su tiriamą medžiaga buvo 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL koncentracijų mėginiuose, o didžiausias skirtumas, kai trietanolamino koncentracija terpėje lygi 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL. Visų variantų ląstelės aktyviai augo eksponentinėje fazėje maždaug iki 24–30 valandos tiek kontroliniame mėginyje, tiek mėginiuose su 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL,

0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL koncentracijomis, 2,1 mg/mL ir 2,4 mg/mL augusios $[psi^-]$, $[PSI^+]^S$ ląstelės stacionarią augimo fazę pasiekė 36 val., o $[PSI^+]^W$ – 30 val. Didžiausiose koncentracijose (2,7 mg/mL ir 3 mg/mL) $[psi^-]$ ląstelių augimas sulėtėjo 39–42 eksperimento valandomis, $[PSI^+]^W$ – 36 val., o $[PSI^+]^S$ – 45–48 val.. Pasitelkiant ANOVA analizės metodą, gauti rezultatai buvo lyginami tarp teigiamos kontrolės ir tyrime naudotų koncentracijų statistiniam reikšmingumui nustatyti. Buvo nustatyta, kad didžiausia trietanolamino koncentracija, kuri nedaro statistiškai reikšmingos įtakos *S. cerevisiae* 74D-694 $[PSI^+]^W$ ir $[PSI^+]^S$ ląstelių augimui yra 1,88 mg/mL, o $[psi^-]$ ląstelėms – 2,1 mg/mL. 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL ir 3 mg/mL koncentracijos tolimesniuose tyrimuose, siekiant nustatyti trietanolamino įtaką prionizacijai, nebus naudojamos, nes šiose koncentracijose ląstelės auga statistiškai reikšmingai prasčiau nei be trietanolamino.

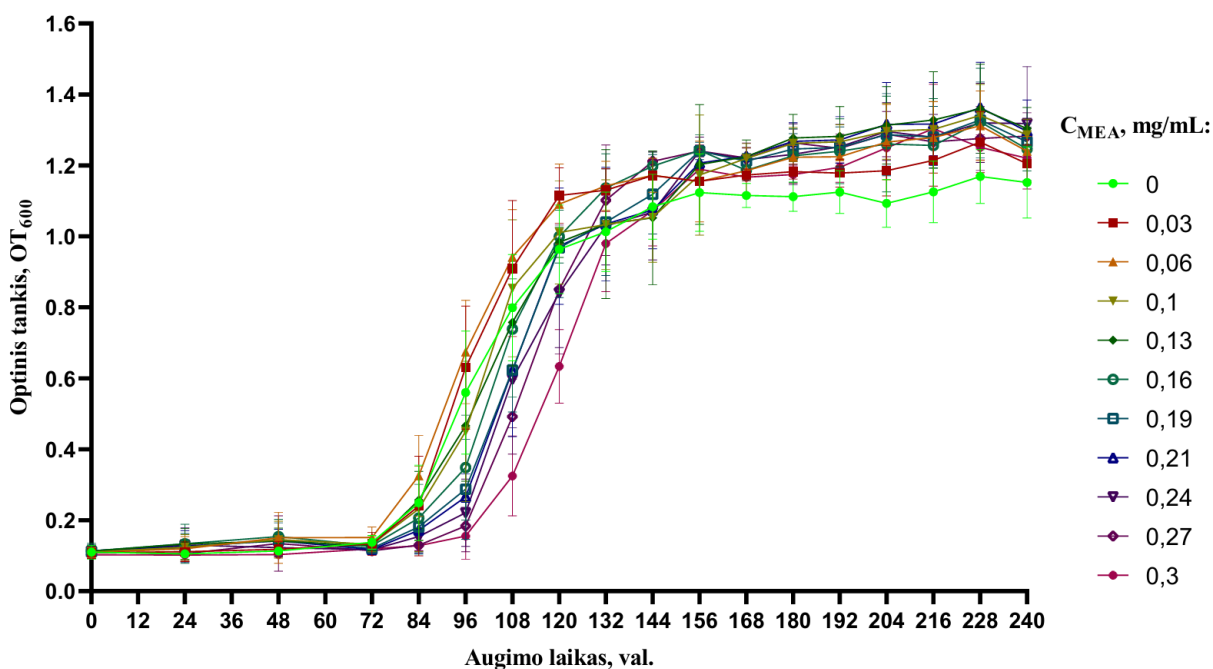
3.3. *S. cerevisiae* 74D-694 $[psi^-]$ ląstelių prionizacija

Toliau pateikiami mielių ląstelių augimo grafikai su atrinktomis etanolaminų koncentracijomis, kurios netrukdo ląstelių augimui. Siekiant sužadinti prioninių baltymų formavimąsi ląstelėse, $[psi^-]$ ląstelės augintos stresinėje aplinkoje – SC^{-ade} terpėje, nes adeninas yra būtinas *S. cerevisiae* 74D-694 kamienui, kad ląstelės išgyventų (plačiau aptarta 2.2.1 skyriuje) (Chernoff *et al.*, 1993).

3.3.1. Monoetanolamino poveikis prionizacijai

Pagal gautus MEA prionizacijos rezultatus sudarytas *S. cerevisiae* 74D-694 $[psi^-]$ ląstelių augimo grafikas (3.15 pav.). Lyginant ląstelių augimo kreives (3.2 pav.) su prionizacijos kreivėmis, galima pastebėti, kad ląstelių augimo greitis ženkliai skiriasi. Stebint MEA poveikį mielių ląstelių augimui, nustatyta, kad lag fazė trunka apie 12 val. (3.2 pav.), o prionizacijos atveju lag fazė pailgėjo iki 72–84 val. (3.15 pav.). Lag fazės pailgėjo dėl to, kad ląstelės turėjo prisitaikyti prie aplinkos, kurioje nėra adenino, o jis yra būtinas auksotrofinių mutacijų turinčioms *S. cerevisiae* 74D-694 $[psi^-]$ kamieno ląstelėms išgyventi. Susiformavus bei išplitus prioniniams baltymams kultūroje, ląstelės pradeda daugintis ir terpėje, kurioje trūksta adenino (Liebman *et al.*, 2012).

Šio tyrimo metu nustatyta, kad kontrolėje (0 mg/mL – kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis) ir mėginiuose su 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL ir 0,24 mg/mL MEA augusių ląstelių eksponentinio augimo fazė prasideda apie 72 augimo valandą, o mėginiuose su didesne MEA koncentracija (0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL) – 84 val. Stacionarią augimo fazę tiek kontrolėje, tiek mėginiuose su MEA ląstelės pasiekė panašiu laiku, apie 156 augimo valandą.



3.15 pav. Monoetanolamino (MEA) poveikis prionų susidarymui *S. cerevisiae* 74D-694 [psi⁺] ląstelėse SC^{-ade} terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai $\pm$ paklaida.

Atlikus ANOVA analizę, buvo nustatyta, kad 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL koncentracijų skirtumai yra statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) lyginant su kontrole. Mažiausioje koncentracijoje (0,03 mg/mL) augusių ląstelių skirtumai nėra statistiškai reikšmingi ($p \geq 0,05$). Buvo nustatyta, kad ląstelės su 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL ir 0,3 mg/mL koncentracija MEA tam tikromis valandomis augo statistiškai reikšmingai prasčiau nei kontrolėje augusios ląstelės. Taip pat buvo nustatytos MEA koncentracijos: 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL, kuriose ląstelės augo statistiškai reikšmingai geriau lyginant su kontrolės mėginiu, tikslus augimo laikas ir koncentracija nurodyti 3.1 lentelėje. Tokie rezultatai rodo, kad kai kurios MEA koncentracijos gali skatinti prionų susidarymą mielėse.

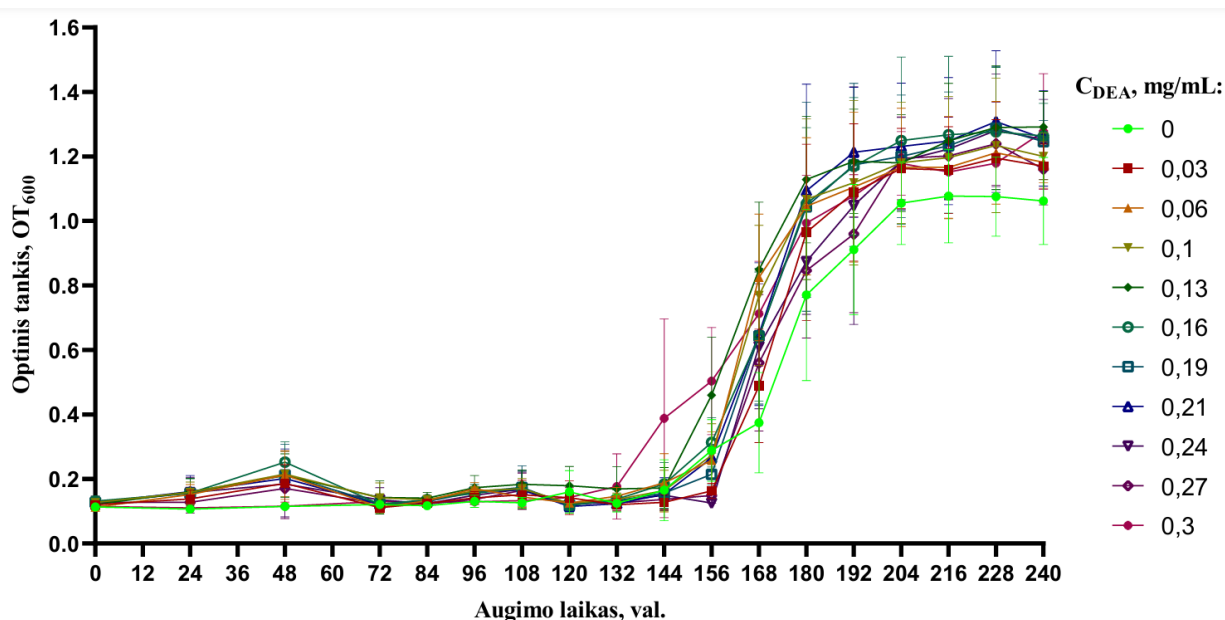
3.1 lentelė. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*] ląstelių augusių su atitinkama monoetanolamino (MEA) koncentracija statistinis reikšmingumas. 1 stulpelis – 0,03 mg/mL, 2 – 0,06 mg/mL, 3 – 0,1 mg/mL, 4 – 0,13 mg/mL, 5 – 0,16 mg/mL, 6 – 0,19 mg/mL, 7 – 0,21 mg/mL, 8 – 0,24 mg/mL, 9 – 0,27 mg/mL, 10 – 0,3 mg/mL. Statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) tarp kontrolės ir mėginių su MEA pažymėti raudona arba žalia spalva. Raudona – ląstelės augusios statistiškai reikšmingai prasčiau lyginant su kontrole, žalia – statistiškai reikšmingai geriau.

		MEA koncentracija, mg/mL									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Augimo laikas, val.	0	0,9981	>0,9999	>0,9999	0,9986	0,9993	>0,9999	0,9784	0,9904	>0,9999	0,9901
	24	0,9999	0,9844	0,9162	0,8103	0,9434	0,9685	0,9452	0,9254	>0,9999	0,8069
	48	>0,9999	0,9569	0,8604	0,5473	0,5871	0,8089	0,5157	0,9973	0,9997	0,3238
	72	0,9998	0,7858	0,9995	0,3625	0,9746	0,2415	0,159	0,3504	0,4067	0,4896
	84	>0,9999	0,4009	0,9709	>0,9999	0,3962	0,0669	0,3904	0,6075	0,3432	0,3637
	96	0,5867	0,2813	0,7038	0,5316	0,0041	0,0011	0,0809	0,0989	0,0686	0,0516
	108	0,9352	0,5642	0,9919	0,9904	0,9132	0,0497	0,1513	0,1403	0,0697	0,0194
	120	0,4346	0,7517	0,9967	>0,9999	0,9999	>0,9999	>0,9999	0,059	0,3613	0,0046
	132	0,6582	0,625	>0,9999	>0,9999	0,2883	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7565	>0,9999
	144	0,2138	0,2332	>0,9999	>0,9999	0,3935	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2488	>0,9999
	156	0,9782	>0,9999	0,9999	0,9965	0,694	0,5852	0,8861	0,6541	0,3385	0,8279
	168	0,3079	0,1217	0,022	0,0591	0,0978	0,0205	0,0436	0,0105	0,0447	0,7747
	180	0,0789	0,0031	0,0134	0,0414	0,1884	0,014	0,0492	0,1296	0,0211	0,4274
	192	0,744	0,0345	0,0206	0,1284	0,4254	0,1448	0,1944	0,0982	0,0501	0,6032
	204	0,2823	0,0081	<0,0001	0,0107	0,0707	0,0159	0,0353	0,0022	0,0211	0,0481
	216	0,7054	0,1293	0,0193	0,1284	0,5059	0,0967	0,2181	0,0266	0,0653	0,4126
	228	0,6069	0,0763	0,0115	0,0792	0,3715	0,0464	0,1478	0,1005	0,1083	0,2249
	240	0,9783	0,6226	0,2545	0,3401	0,8792	0,6157	0,6946	0,7224	0,2647	0,9659

Taigi, tiriant MEA įtaką mielių prionizacijai, nustatyta, kad tirta medžiaga daugeliu atvejų turėjo skatinantį poveikį prionų susidarymui [*psi*] ląstelėse. Gauti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp kontrolinių mėginių ir mėginių su 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL MEA. Tai rodo, kad tirtuose mėginiuose augusioms mielių ląstelėms, jas supanti aplinka galėjo turėti įtakos. Taip pat, negalima atmesti galimybės, kad skirtumai galėjo atsirasti dėl žmogiškos klaidos. Tokie veiksniai, kaip matavimo paklaidos, pilstymo klaidos ruošiant ląstelių tirpalus, netikslus mėginių išpilstymas į mikroplokšteles galėjo turėti įtakos gautiems rezultatams. Svarbu paminėti, kad tokie mikroplokštelių praskiedimo metodo tikslumo trūkumai, kaip daugartinė sklaida (angl. *multiple scattering*) ir tiriamos medžiagos sukeltas OT kreivės iškreipimas, reikšmingai prisidedant prie sklaidos arba absorbcijos, irgi galėjo turėti įtakos gautiems rezultatams (Krishnamurthi *et al.*, 2021). Taip pat, buvo nustatyta, kad tiek kontroliniuose mėginiuose, tiek mėginiuose su atitinkama MEA koncentracija ląstelių augimo fazė prasidėjo 72–84 augimo valandą, o stacionari – 156 val.

3.3.2. Dietanolamino poveikis prionizacijai

Tiriant DEA įtaką ląstelių prionizacijai, surinkti duomenys parodė, kad kontrolėje (0 mg/mL – kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis) augusių ląstelių ir ląstelių augusių su 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL ir 0,3 mg/mL DEA lag fazė truko apie 132 val., o 0,03 mg/mL, 0,24 mg/mL ir 0,27 mg/mL koncentracijos mėginiuose – 156 val. (3.16 pav.). Visuose mėginiuose – tiek kontrolėje, tiek su tiriamą medžiaga – ląstelės eksponentiškai dalijosi iki 204 augimo valandos.



3.16 pav. Dietanolamino (DEA) poveikis prionų susidarymui *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁺] ląstelėse SC^{ade} terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± paklaida.

Statistinės analizės pagalba buvo nustatytas kontrolės mėginio ir mėginių su skirtingomis DEA koncentracijomis skirtumų statistinis reikšmingumas (3.2 lentelė). Lyginant kontrolės ir mėginių su DEA skirtumus, ANOVA analizė parodė, kad mėginiuose su 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$), mėginiuose su 0,03 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL – statistiškai nereikšmingi skirtumai ($p \geq 0,05$). Taip pat, 3.2 lentelė vaizduoja, kad tam tikromis augimo valandomis 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL ir 0,3 mg/mL mėginiuose ląstelės augo statistiškai reikšmingai geriau, o 0,24 mg/mL ir 0,27 mg/mL – statistiškai reikšmingai prasčiau lyginant su kontrole.

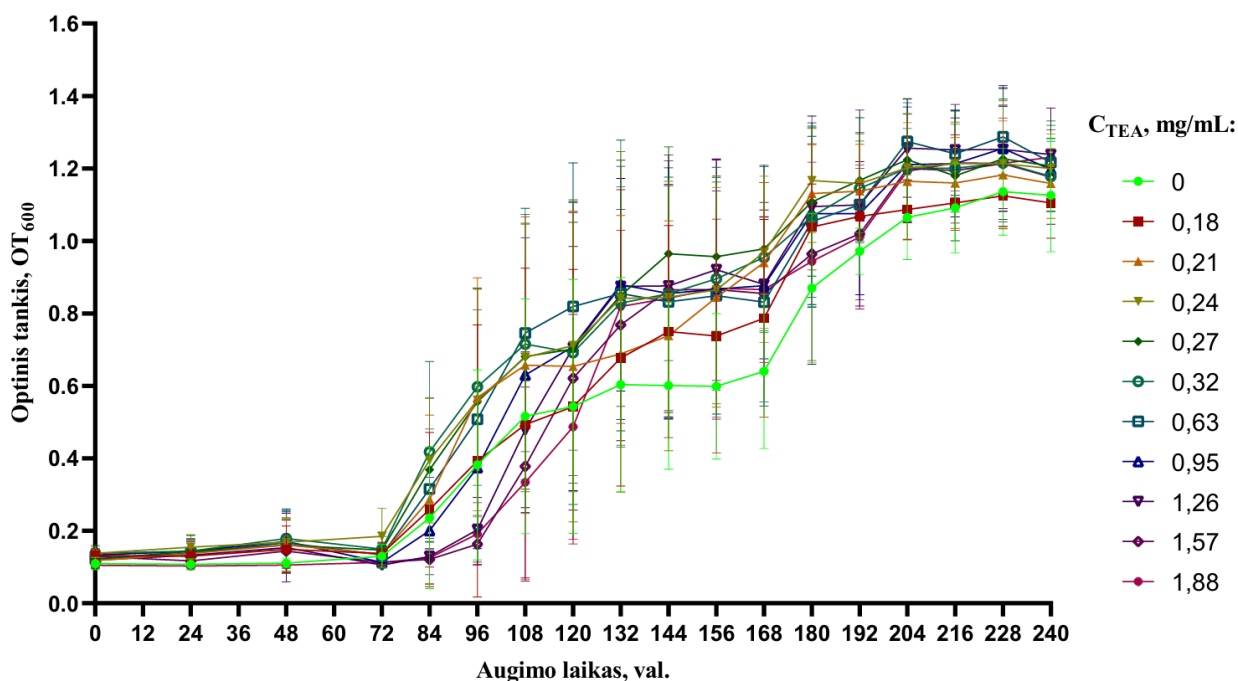
3.2 lentelė. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [psi] ląstelių augusių su atitinkama dietanolamino (DEA) koncentracija statistinis reikšmingumas. 1 stulpelis – 0,03 mg/mL, 2 – 0,06 mg/mL, 3 – 0,1 mg/mL, 4 – 0,13 mg/mL, 5 – 0,16 mg/mL, 6 – 0,19 mg/mL, 7 – 0,21 mg/mL, 8 – 0,24 mg/mL, 9 – 0,27 mg/mL, 10 – 0,3 mg/mL. Statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) tarp kontrolės ir mėginių su DEA pažymėti raudona arba žalia spalva. Raudona – ląstelės augusios statistiškai reikšmingai prasčiau lyginant su kontrole, žalia – statistiškai reikšmingai geriau.

	DEA koncentracija, mg/mL									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Augimo laikas, val.										
0	0,7732	>0,9999	0,3775	0,8852	0,0762	0,2986	0,2726	0,227	0,2615	>0,9999
24	0,1561	0,064	0,0487	0,103	0,2032	0,2316	0,2503	0,2685	0,8049	0,9898
48	0,1945	0,1809	0,1118	0,1059	0,0291	0,3667	0,4443	0,8014	0,8815	>0,9999
72	0,2171	0,4878	0,9935	0,9965	>0,9999	0,9998	>0,9999	0,997	>0,9999	0,9981
84	0,939	0,5714	0,7316	0,7311	0,6384	0,2613	0,7596	0,886	0,9916	0,145
96	0,7305	0,2165	0,1616	0,7251	0,943	0,6223	0,2566	0,6237	0,9999	>0,9999
108	0,939	0,5643	0,3146	0,7061	0,6061	0,8269	0,8903	0,6596	0,8241	>0,9999
120	0,8284	0,9149	0,9736	0,5602	0,812	0,8214	0,7607	0,8499	0,9026	0,9996
132	0,9996	0,906	0,9319	0,3989	0,9951	0,9393	>0,9999	0,9973	>0,9999	0,9805
144	0,8039	>0,9999	>0,9999	0,964	0,665	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9711	0,8906
156	0,0658	0,9995	>0,9999	0,9004	0,9996	0,3423	0,9965	0,0204	0,0491	0,3898
168	0,9166	0,0483	0,1331	0,0798	0,1669	0,2115	0,2311	0,3654	0,1377	0,3459
180	0,9424	0,831	0,7605	0,0428	0,009	0,7616	0,4057	0,9683	0,9966	0,8162
192	0,5057	0,0309	0,4293	0,1196	0,4473	0,2369	0,1365	0,973	>0,9999	0,6092
204	0,3384	0,5621	0,8924	0,8111	0,803	0,1434	0,1448	0,3184	0,5637	0,0511
216	0,9913	0,9621	0,9361	0,6965	0,9252	0,7484	0,6307	0,7228	0,7412	0,948
228	0,6038	0,3621	0,6203	0,2746	0,3852	0,2713	0,2347	0,1772	0,1286	0,3351
240	0,8921	0,427	0,2332	0,2703	0,4144	0,3089	0,4165	0,4483	0,4847	0,0335

Taigi, buvo nustatyta, kad DEA turi įtakos mielių prionizacijai. Tai patvirtina gauti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp kontrolės ir mėginių su 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL DEA. Buvo nustatyta ir ląstelių lag fazė, kuri truko 132–156 val. ir eksponentinis augimas, kuris visuose mėginiuose truko iki 204 val.

3.3.3. Trietanolamino poveikis prionizacijai

Pagal sudarytas ląstelių su TEA prionizacijos kreives (3.17 pav.) galima matyti, kad kontrolėje (0 mg/mL – kontrolė su vandeniu ir skysta terpe su ląstelėmis) ir mėginiuose su mažesne TEA koncentracija (0,18 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL) ląstекės pradėjo augti apie 72 augimo valandą. Ląstelių augusių su 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL ir 1,88 mg/mL TEA lag fazė truko ilgiau – apie 84 val. Pastebėta, kad visuose mėginiuose augusių ląstelių augimo dinamika yra panaši, eksponentiškai ląstelės dalijosi apie 132 val., pasiekdamos stacionarią augimo fazę ties 204 matavimo valandą.



3.17 pav. Trietanolamino (tEA) poveikis prionų susidarymui *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁺] ląstelėse SC^{ade} terpėje. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai $\pm$ paklaida.

ANOVA dispersinės analizės būdu kontrolės ir mėginių su skirtingomis TEA koncentracijomis buvo tikrinamas statistinis reikšmingumas (3.3 lentelė). Nustatytas statistškai reikšmingas ($p < 0,05$) skirtumas tarp kontrolėje augusių ląstelių ir ląstelių su 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 1,26 mg/mL TEA. 3.3 lentelė vaizduoja, kad šių koncentracijų mėginiuose 180 val. arba 192 val. ląstelės augo statistškai reikšmingai geriau lyginant su kontrolėje augusiomis ląstelėmis. Taip pat, nustatyta, kad skirtumai tarp kontrolės ir 0,18 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL TEA nėra statistškai reikšmingi ($p \geq 0,05$).

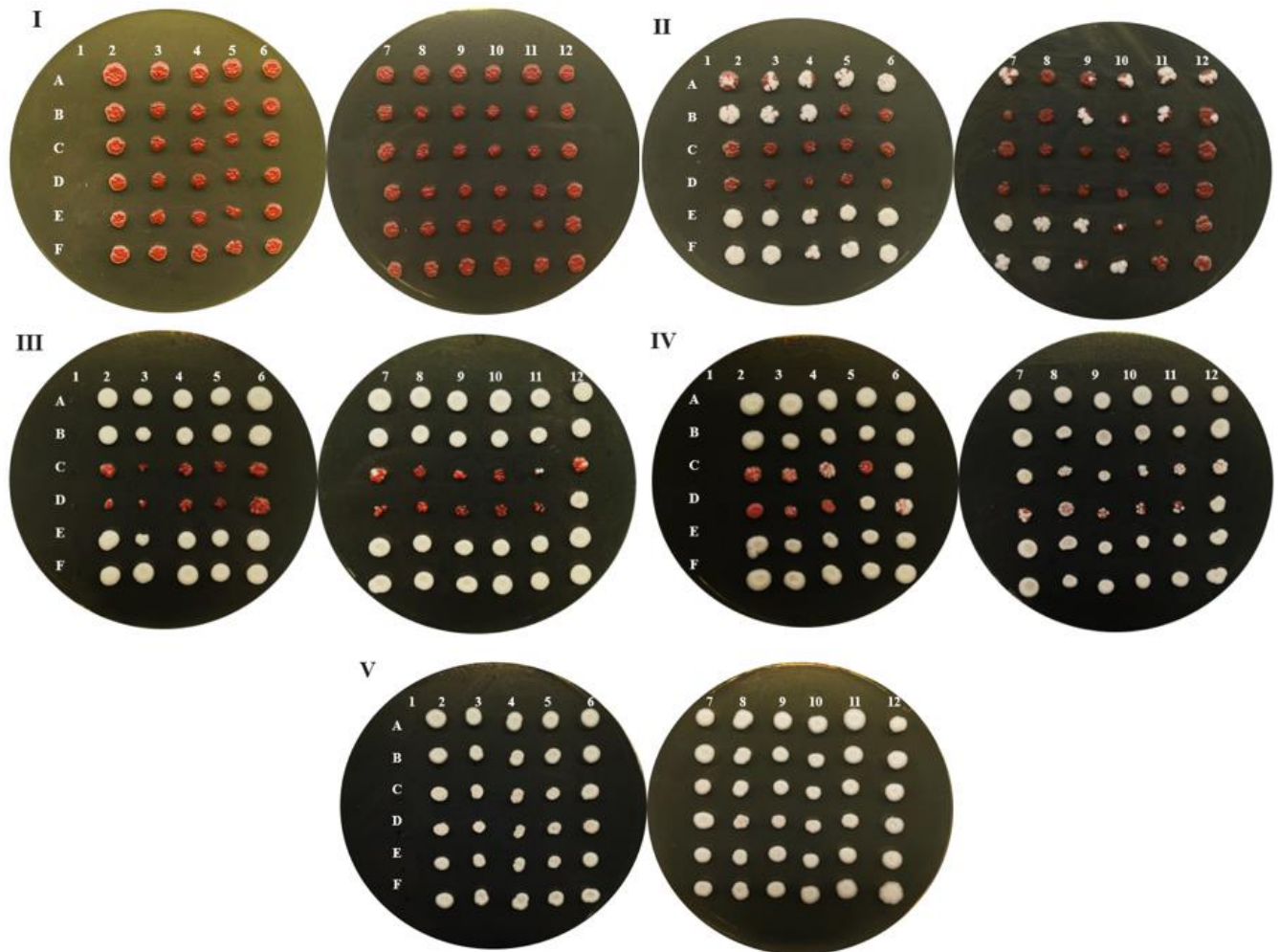
3.3 lentelė. Mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelių augusių su atitinkama trietanolamino (TEA) koncentracija statistinis reikšmingumas. 1 stulpelis – 0,18 mg/mL, 2 – 0,21 mg/mL, 3 – 0,24 mg/mL, 4 – 0,27 mg/mL, 5 – 0,32 mg/mL, 6 – 0,63 mg/mL, 7 – 0,95 mg/mL, 8 – 1,26 mg/mL, 9 – 1,57 mg/mL, 10 – 1,88 mg/mL. Statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$) tarp kontrolės ir mėginių su TEA pažymėti raudona arba žalia spalva. Raudona – ląstelės augusios statistiškai reikšmingai prasčiau lyginant su kontrole, žalia – statistiškai reikšmingai geriau.

	TEA koncentracija, mg/mL									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0,0544	0,4318	0,0506	0,5127	0,0807	0,2064	0,1661	0,1258	0,0857	0,9802
24	0,275	0,5264	0,1907	0,6039	0,419	0,6224	0,4355	0,788	0,9835	0,9859
48	0,8558	0,7226	0,5413	0,7175	0,5665	0,7735	0,7515	0,9706	0,9898	0,7514
72	0,9526	0,9679	0,828	0,9936	0,8949	>0,9999	0,729	0,5852	0,8248	0,9375
84	0,4447	0,2721	0,6714	0,796	0,8292	0,9883	>0,9999	0,9462	0,8881	0,9316
96	>0,9999	0,672	0,6207	0,821	0,4661	0,7847	>0,9999	0,8555	0,6579	0,8922
108	>0,9999	0,9748	0,9	0,9049	0,7438	0,498	0,9988	>0,9999	0,9993	0,9921
120	>0,9999	0,9919	0,9598	0,883	0,9429	0,7544	0,8589	0,8833	0,9998	>0,9999
132	0,9973	0,9984	0,8818	0,6487	0,7707	0,8426	0,5915	0,5457	0,8497	0,6061
144	0,6754	0,9562	0,6578	0,1947	0,6462	0,7306	0,7241	0,6364	0,7584	0,4039
156	0,9895	0,6614	0,6533	0,1413	0,4457	0,7498	0,5218	0,4127	0,7885	0,7288
168	0,9944	0,4054	0,1323	0,2898	0,3896	0,9343	0,9262	0,7045	0,7738	0,7118
180	0,3194	0,0375	0,0083	0,0575	0,1433	0,1911	0,1467	0,0316	0,9646	0,8809
192	0,2245	0,0987	0,0465	0,1548	0,0321	0,0447	0,948	0,9274	0,9981	0,9998
204	>0,9999	0,9196	0,6629	0,6207	0,5338	0,1494	0,5175	0,1849	0,35	0,1953
216	>0,9999	0,8875	0,1857	0,9824	0,7395	0,3207	0,58	0,1409	0,1325	0,3185
228	>0,9999	0,9905	0,9658	0,9529	0,8892	0,1623	0,6981	0,5609	0,5119	0,874
240	0,9992	0,9841	0,7339	0,8953	0,9895	0,7785	0,8792	0,6175	0,7759	0,9965

Toliau buvo tikrinamas *S. cerevisiae* ląstelių kultūros grynumas (3.18 pav.). Pagal pateiktą paveikslėlį, galima teigti, jog tirtos kultūros yra grynios, mėginiuose augo mielių ląstelės ir suformuotos kolonijos atitinka *PSI* fenotipui būdingą morfologiją (Sherman, 2002).

Ląstelės augusios skystose SC^{ade} terpėse buvo persėjamos ant kietos YPD terpės po 2, 4, 6, 8 ir 10 augimo dienų. Pagal suformuotas raudonos spalvos kolonijas (3.18 pav. I) matoma, kad dvi dienas augusios [*psi*⁻] ląstelės dar neturėjo susiformavusių *PSI* prionų. Po 4 augimo dienų jau matoma, kad dauguma atvejų, ląstelės tiek kontrolėje, tiek mėginiuose su MEA ir TEA pradeda formuoti stiprius [*PSI*⁺]^S prionus, tai patvirtina ląstelių suformuotos baltos spalvos kolonijos (3.18 pav. II). Pastebima, kad keliuose mėginiuose augo ląstelės dar neturinčios prionų (3.18 pav. 8A, 5B, 6B, 7B, 8B, 11E, 12E, 11F, 12F). Taip pat, 3.18 pav. vaizduoja, kad bandymo metu 4 dienas augusios ląstelės su skirtingomis DEA koncentracijomis neformavo prionų (3.18 pav. 2C–12C ir 2D–12D (II)), nes matomos raudonos spalvos kolonijos. Po 6 dienų augimo visos ląstelės augusios su MEA ir TEA suformavo baltos spalvos kolonijas (3.18 pav. III). Stebint mėginius su DEA, nustatyta, kad augo tiek prionų neturinčios ląstelės, tiek jų turinčios (3.18 pav. 7C, 11C, 12C, 12D (III)). Po 8 augimo dienų, matoma, kad beveik visuose mėginiuose su DEA ląstelės pradeda formuoti prioninius baltymus (3.18 pav. IV). Po 10 augimo dienų išsėtos ląstelės parodė, kad visi stebėti mėginiai – tiek kontrolėje, tiek skirtingose MEA, DEA, TEA

koncentracijose augusios ląstelės – suformavo baltos spalvos kolonijas (3.18 pav. V). Tai reiškia, kad mielių ląstelėse buvo susiformavę stiprūs prioniniai baltymai (Chernoff *et al.*, 2020; Lemarre *et al.*, 2020).



3.18 pav. Monoetanolamino (MEA), dietanolamino (DEA) ir trietanolamino (TEA) įtaka mielių *S. cerevisiae* 74D-694 [psi⁺] ląstelių prionizacijai. Ląstelės buvo išsėtos ant kietų YPD terpių po 2 (I), 4 (II), 6 (III), 8 (IV) ir 10 (V) augimo dienų. A ir B – skirtingos MEA koncentracijos; C ir D – skirtingos DEA koncentracijos; E ir F – skirtingos TEA koncentracijos. 1 – švaros kontrolė (be ląstelių), 2 – 0 mg/mL, 3 (A–D) – 0,03 mg/mL, 3 (E–F) – 0,18 mg/mL, 4 (A–D) – 0,06 mg/mL, 4 (E–F) – 0,21 mg/mL, 5 (A–D) – 0,1 mg/mL, 5 (E–F) – 0,24 mg/mL, 6 (A–D) – 0,13 mg/mL, 6 (E–F) – 0,27 mg/mL, 7 (A–D) – 0,16 mg/mL, 7 (E–F) – 0,32 mg/mL, 8 (A–D) – 0,19 mg/mL, 8 (E–F) – 0,63 mg/mL, 9 (A–D) – 0,21 mg/mL, 9 (E–F) – 0,95 mg/mL, 10 (A–D) – 0,24 mg/mL, 10 (E–F) – 1,26 mg/mL, 11 (A–D) – 0,27 mg/mL, 11 (E–F) – 1,57 mg/mL, 12 (A–D) – 0,3 mg/mL, 12 (E–F) – 1,88 mg/mL.

Lyginant visus mėginius tarpusavyje, pastebima tendencija, jog beveik visais tyrimo atvejais mėginiuose su skirtingomis MEA, DEA arba TEA koncentracijomis ląstelės augo panašiai kaip ir kontroliniuose mėginiuose. Tiriant MEA ir TEA poveikį mielių ląstelių prionizacijai, nustatyta, kad ląstelių augusių visuose mėginiuose lag fazė truko apie 72 val., o DEA – apie 132 val. Galimai MEA ir

TEA prisidėjo prie amiloidinių fibrilių fragmentacijos, kuri sutrumpina lag fazės trukmę arba mėginiuose su DEA susidarė mažiau prionų arba jie išplito vėliau nei kituose mėginiuose, todėl ląstelių lag fazė buvo ilgesnė (Meisl *et al.*, 2016; Chernova *et al.*, 2019). Taip pat, tokie rezultatų skirtumai galėjo atsirasti ir dėl pilstymo klaidų, pavyzdžiui, gali būti, kad į mėginius buvo užsėtas mažesnis arba didesnis ląstelių kiekis. Lyginant statistinio reikšmingumo duomenis, matoma, kad tiriant visų trijų medžiagų (MEA, DEA, TEA) poveikį prionizacijai, visais atvejais kontrolės ir mažiausios tiriamos medžiagos koncentracijos (MEA ir DEA – 0,03 mg/mL, TEA – 0,18 mg/mL) skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi ($p \geq 0,05$). ANOVA analizė patvirtino statistiškai reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp kontrolės ir tirtos medžiagos: 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL MEA, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL DEA, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 1,26 mg/mL TEA. Taip pat buvo nustatytos ir koncentracijos, kuriose augusios ląstelės, tam tikru augimo momentu, augo statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) geriau arba blogiau lyginant su kontrolėje augusiomis ląstelėmis (3.1–3.2 lentelės). Mėginiuose su 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,3 mg/mL MEA statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) geriau ląstelės augo 168 val., 180 val., 192 val., 204 val., 216 val. arba 228 val., blogiau – 96, 108 arba 120 augimo valandą. Su 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL ir 0,3 mg/mL DEA statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) geriau ląstelės augo 24 val., 48 val., 168 val., 180 val., 192 val. arba 240 val., o blogiau – 156 val. su 0,24 mg/mL ir 0,27 mg/mL DEA. Taip pat, matoma (3.3 lentelė), kad 180 augimo valandą ląstelės su 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL ir 1,26 mg/mL TEA bei 192 val. – 0,24 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL TEA augo statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) geriau nei kontrolėje augusios ląstelės.

Apibendrinus galima teigti, kad visos tirtos medžiagos turėjo poveikį ląstelių augimui ir atliekant ląstelių prionizacijos stebėjimus, tam tikrais laiko momentais skatino prionų susidarymą mielių ląstelėse, buvo nustatyti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp kontrolinių mėginių ir mėginių su MEA, DEA, TEA. Du junginiai – MEA ir DEA – išsiskyrė tuo, kad šių etanolaminų esant atitinkamai 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL ir 0,3 mg/mL arba 0,24 mg/mL ir 0,27 mg/mL, tam tikrais laiko momentais slopino prionų susidarymą, ląstelės augo statistiškai reikšmingai prasčiau nei kontrolėse. Yra žinoma, kad monoetanolaminas yra naujas anti-prioninis junginys, galintis sumažinti PrP^{Sc} kiekį prionais užkrėstose ląstelėse ir atitolinti prionų ligą prionais infekuotose pelėse (Uchiyama *et al.*, 2021), tačiau literatūroje nėra aprašomas etanolamino junginių poveikis mielių prionams. Taip pat, yra įrodyta, kad kai kurių anti-

prioninių junginių poveikis gali būti specifinis prionui (Du *et al.*, 2019), todėl MEA gali sumažinti prionų kiekį pelėse, bet galimai to padaryti mielių ląstelėse negali. Siekiant pagrįsti gautus etanolino junginių rezultatus, būtų tikslinga atlikti daugiau bandymo pakartojimų.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui daro neigiamą įtaką 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL, 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL koncentracijos monoetanolamino bei dietanolamino tirpalas ir 2,1 mg/mL, 2,4 mg/mL, 2,7 mg/mL, 3 mg/mL koncentracijos trietanolamino tirpalas.
2. Nustatyta, kad didžiausia monoetanolamino ir dietanolamino koncentracija, kuri nedaro statistiškai reikšmingos įtakos *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^W ir [*PSI*⁺]^S ląstelių augimui yra 0,3 mg/mL, trietanolamino – 1,88 mg/mL.
3. Nustatyta, kad didžiausia monoetanolamino ir dietanolamino koncentracija, kuri nedaro statistiškai reikšmingos įtakos *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelių prionizacijai yra 0,03 mg/mL, o trietanolamino – 0,18 mg/mL. Tuo tarpu, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,3 mg/mL monoetanolamino ir dietanolamino bei 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL trietanolamino – statistiškai reikšmingą įtaką.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Kazys Žitkus
Bakalauro baigiamasis darbas

**ETANOLAMINŲ ĮTAKA [PSI] PRIONO ATSIKIDIMUI
SACCHAROMYCES CEREVISIAE LĄSTELĖSE**

SANTRAUKA

Prionai yra neįprastos formos infekciniai baltymai, kurie sukelia mirtinas neurodegeneracines ligas, tokias kaip avių ir ožkų skrepi liga, galvijų spongiforminė encefalopatija, žmogaus Creutzfeldt-Jakob liga. Prionai yra atsparūs tiek proteazėms, tiek įvairiems tradiciniams dezinfekcijos būdams, todėl iki šiol nėra atrasta efektyvių vaistų, kurie galėtų prisidėti prioninių ligų gydyme. Prionų sukeltas patogeniškumas ir jų plitimo mechanizmai yra iki šiol aktuali tema moksliniuose tyrimuose, siekiant surasti junginių, kurie galėtų inhibuoti prioninių baltymų formavimąsi ir plitimą. Literatūros šaltiniuose yra rašoma, kad etanolaminai gali turėti antiprioninių poveikiu pasižyminčių savybių. Etanolaminas priklauso alifatinių aminoalkoholių klasei ir gali būti aptinkamas įvairių organizmų virškinimo trakte. Tyrimui buvo pasirinkti 3 junginiai: monoetanolaminas (MEA), dietanolaminas (DEA) ir trietanolaminas (TEA). Dėl paprastų augimo sąlygų ir galingų genetinių metodų prieinamumo mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra plačiai naudojama modelinė sistema, tinkama prioninių baltymų tyrimuose. Aprašytame tyrime buvo siekiama išsiaiškinti, kaip etanolaminai gali paveikti [PSI] prionų susidarymą *S. cerevisiae* 74D-694 [psi⁻] kamieno ląstelėse. Šiam tikslui pasiekti naudojamas mikroplokštelių praskiedimo metodas, o ląstelės augintos skystoje terpėje su skirtingomis etanolaminų koncentracijomis. Tyrimo metu buvo sudarytos *S. cerevisiae* augimo ir prionizacijos kreivės. Pasirinktos naudoti 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,13 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,19 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL ir 0,3 mg/mL MEA ir DEA tirpalų koncentracijos bei 0,18 mg/mL, 0,21 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,95 mg/mL, 1,26 mg/mL, 1,57 mg/mL, 1,88 mg/mL TEA tirpalų koncentracijos. Padarytos išvados, kad didžiausia MEA ir DEA koncentracija, kuri nedaro statistiškai reikšmingos įtakos *S. cerevisiae* 74D-694 [psi⁻] ląstelių prionizacijai yra 0,03 mg/mL, o TEA – 0,18 mg/mL. Remiantis gautais rezultatais, galima manyti, kad etanolaminai skatina prionų susidarymą mielių ląstelėse.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Kazys Žitkus
Bachelor thesis

EFFECT OF ETHANOLAMINES ON *[PSI]* PRION FORMATION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS

SUMMARY

Prions are abnormally shaped infectious proteins that cause fatal neurodegenerative diseases such as sheep and goat scrapie, bovine spongiform encephalopathy, and human Creutzfeldt-Jakob disease. Prions are resistant both to proteases and to various traditional disinfection agents, so no effective drugs have yet been discovered that could contribute to the treatment of prion diseases. The pathogenicity caused by prions and the mechanisms of their spread are still a hot topic in scientific research in order to find compounds that could inhibit the formation and spread of prion proteins. The literature suggests that ethanolamines may have anti-prion properties. Ethanolamine belongs to the class of aliphatic amino alcohols and can be found in the digestive tract of various organisms. 3 compounds were chosen for the study: monoethanolamine (MEA), diethanolamine (DEA) and triethanolamine (TEA). Due to its simple growth conditions and the availability of powerful genetic techniques, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a widely used model system suitable for studies of prion proteins. The described study aimed to elucidate how ethanolamines can affect *[PSI]* prion formation in *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] strain cells. To achieve this goal, a microplate dilution method is used, and cells are grown in liquid medium with different concentrations of ethanolamines. During the study, the growth and prionization curves of *S. cerevisiae* were drawn. Selected to use 0.03 mg/mL, 0.06 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.13 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.19 mg/mL, 0.21 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.27 mg/mL, and 0.3 mg/mL concentrations of MEA and DEA solutions and 0.18 mg/mL, 0.21 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.27 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.63 mg/mL, 0.95 mg/mL, 1.26 mg/mL, 1.57 mg/mL, 1.88 mg/mL TEA solution concentrations. It was concluded that the maximum concentration of MEA and DEA, which does not have a statistically significant effect on the prionization of *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] cells, is 0.03 mg/mL, and TEA is 0.18 mg/mL. Based on the obtained results, it can be assumed that ethanolamines promote the formation of prions in yeast cells.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. 2-aminoethanol | C_2H_7NO , 2023 – PubChem. (n.d.). Retrieved May 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanolamine>
2. 2,2'-Iminodiethanol | $C_4H_{11}NO_2$, 2023 – PubChem. (n.d.). Retrieved May 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethanolamine>
3. 2,2',2''-Nitrilotriethanol | $C_6H_{15}NO_3$, 2023 – PubChem. (n.d.). Retrieved May 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triethanolamine>
4. Aguzzi, A., Heikenwalder, M. and Polymenidou, M. (2007) 'Insights into prion strains and neurotoxicity', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), pp. 552–561. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2204>.
5. Altuna, M. et al. (2022) 'Role of Biomarkers for the Diagnosis of Prion Diseases: A Narrative Review', *Medicina*, 58(4), p. 473. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina58040473>.
6. Babelhadj, B. et al. (2018) 'Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria', *Emerging Infectious Diseases*, 24(6), pp. 1029–1036. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2406.172007>.
7. Barbee, S.J. and Hartung, R. (1979) 'The effect of diethanolamine on hepatic and renal phospholipid metabolism in the rat', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 47(3), pp. 421–430. Available at: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(79\)90511-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(79)90511-8).
8. Calzada, E., Onguka, O. and Claypool, S.M. (2016) 'Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease', in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 29–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>.
9. Chernoff, Y.O. et al. (1995) 'Role of the Chaperone Protein Hsp104 in Propagation of the Yeast Prion-Like Factor [psi⁺]', *Science*, 268(5212), pp. 880–884. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7754373>.
10. Chernoff, Y.O. et al. (2020a) 'Application of yeast to studying amyloid and prion diseases', in *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 293–380. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.01.002>.
11. Chernoff, Y.O. et al. (2020b) 'Application of yeast to studying amyloid and prion diseases', in *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 293–380. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.01.002>.
12. Chernoff, Y.O., Derkach, I.L. and 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), pp. 268–270. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00351802>.
13. Chernova, T.A., Chernoff, Y.O. and Wilkinson, K.D. (2019) 'Yeast Models for Amyloids and Prions: Environmental Modulation and Drug Discovery', *Molecules*, 24(18), p. 3388. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24183388>.
14. Chernova, T.A., Wilkinson, K.D. and Chernoff, Y.O. (2017) 'Prions, Chaperones, and Proteostasis in Yeast', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2), p. a023663. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023663>.
15. Cox, B. and Tuite, M. (2018) 'The life of [PSI]', *Current Genetics*, 64(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0714-7>.
16. Craciunescu, C.N., Wu, R. and Zeisel, S.H. (2006) 'Diethanolamine alters neurogenesis and induces apoptosis in fetal mouse hippocampus', *The FASEB Journal*, 20(10), pp. 1635–1640. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.06-5978com>.
17. Du, Z. et al. (2019) 'Identifying Anti-prion Chemical Compounds Using a Newly Established Yeast High-Throughput Screening System', *Cell Chemical Biology*, 26(12), pp. 1664–1680.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.10.004>.
18. Fiume, M.M. et al. (2013) 'Safety Assessment of Triethanolamine and Triethanolamine-Containing Ingredients as Used in Cosmetics', *International Journal of Toxicology*,

- 32(3_suppl), pp. 59S-83S. Available at: <https://doi.org/10.1177/1091581813488804>.
19. Fowler, N.O. *et al.* (1976) 'Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs', *The American Journal of Cardiology*, 37(2), pp. 223–230. Available at: [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90316-7](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90316-7).
 20. Frost, B. and Diamond, M.I. (2010) 'Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases', *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), pp. 155–159. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn2786>.
 21. Grant, C.M. (2015) 'Sup35 methionine oxidation is a trigger for *de novo* [PSI⁺] prion formation', *Prion*, 9(4), pp. 257–265. Available at: <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1065372>.
 22. Holec, S.A.M., Block, A.J. and Bartz, J.C. (2020) 'The role of prion strain diversity in the development of successful therapeutic treatments', in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 77–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.07.001>.
 23. Hoover, C.E. *et al.* (2017) 'Endogenous Brain Lipids Inhibit Prion Amyloid Formation *In Vitro*', *Journal of Virology*. Edited by B. Caughey, 91(9), pp. e02162-16. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02162-16>.
 24. Ibrahim, A.Y., Ashour, F.H. and Gadalla, M.A. (2021) 'Exergy study of amine regeneration unit using diethanolamine in a refinery plant: A real start-up plant', *Heliyon*, 7(2), p. e06241. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06241>.
 25. Imran, M. and Mahmood, S. (2011) 'An overview of human prion diseases', *Virology Journal*, 8(1), p. 559. Available at: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-559>.
 26. Ishikawa, T. (2021) 'Saccharomyces cerevisiae in neuroscience: how unicellular organism helps to better understand prion protein?', *Neural Regeneration Research*, 16(3), p. 489. Available at: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.293137>.
 27. Kahn, T. *et al.* (1975) 'Effect of sodium nitrate loading on electrolyte transport by the renal tubule', *The American Journal of Physiology*, 229(3), pp. 746–753. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.229.3.746>.
 28. Kaval, K.G. and Garsin, D.A. (2018) 'Ethanolamine Utilization in Bacteria', *mBio*. Edited by V. Sperandio, 9(1), pp. e00066-18. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00066-18>.
 29. Keefer, K.M., Stein, K.C. and True, H.L. (2017) 'Heterologous prion-forming proteins interact to cross-seed aggregation in *Saccharomyces cerevisiae*', *Scientific Reports*, 7(1), p. 5853. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05829-5>.
 30. Kim, D.-J. *et al.* (2010) 'Biodegradation of monoethanolamine in aerobic and anoxic conditions', *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(5), pp. 1521–1526. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0285-5>.
 31. Krishnamurthi, V.R. *et al.* (2021) 'A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers', *PLOS ONE*. Edited by R.P. Barnwal, 16(1), p. e0245205. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>.
 32. Krysenko, S. *et al.* (2019) 'Initial Metabolic Step of a Novel Ethanolamine Utilization Pathway and Its Regulation in *Streptomyces coelicolor* M145', *mBio*. Edited by L. Søgaard-Andersen, 10(3), pp. e00326-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00326-19>.
 33. Kübler, E., Oesch, B. and Raeber, A.J. (2003) 'Diagnosis of prion diseases', *British Medical Bulletin*, 66(1), pp. 267–279. Available at: <https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.267>.
 34. Legname, G. (2017) 'Elucidating the function of the prion protein', *PLOS Pathogens*. Edited by H.L. True, 13(8), p. e1006458. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006458>.
 35. Legname, G. (2023) 'Copper coordination modulates prion conversion and infectivity in mammalian prion proteins', *Prion*, 17(1), pp. 1–6. Available at:

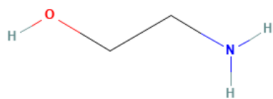
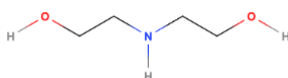
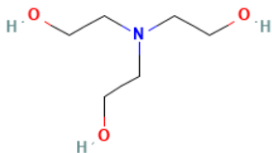
- <https://doi.org/10.1080/19336896.2022.2163835>.
36. Lemarre, P., Pujo-Menjouet, L. and Sindi, S.S. (2020) 'A unifying model for the propagation of prion proteins in yeast brings insight into the [PSI⁺] prion', *PLOS Computational Biology*. Edited by P.K. Maini, 16(5), p. e1007647. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007647>.
 37. Leung, H.-W., Kamendulis, L.M. and Stott, W.T. (2005) 'Review of the carcinogenic activity of diethanolamine and evidence of choline deficiency as a plausible mode of action', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), pp. 260–271. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.001>.
 38. Liebman, S.W. and Chernoff, Y.O. (2012) 'Prions in Yeast', *Genetics*, 191(4), pp. 1041–1072. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137760>.
 39. Ma, J. and Lindquist, S. (1999) 'De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells', *Nature Cell Biology*, 1(6), pp. 358–361. Available at: <https://doi.org/10.1038/14053>.
 40. Marciniuk, K., Taschuk, R. and Napper, S. (2013) 'Evidence for Prion-Like Mechanisms in Several Neurodegenerative Diseases: Potential Implications for Immunotherapy', *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/473706>.
 41. Mead, S. and Reilly, M.M. (2015) 'A new prion disease: relationship with central and peripheral amyloidoses', *Nature Reviews Neurology*, 11(2), pp. 90–97. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.263>.
 42. Meisl, G. *et al.* (2016) 'Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models', *Nature Protocols*, 11(2), pp. 252–272. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.010>.
 43. Millhauser, G.L. (2007) 'Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease', *Annual Review of Physical Chemistry*, 58(1), pp. 299–320. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104657>.
 44. Morales, R. (2017) 'Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease', *PLOS Pathogens*. Edited by H.L. True, 13(7), p. e1006323. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006323>.
 45. Nevzglyadova, O.V. *et al.* (2011) 'The effect of red pigment on the amyloidization of yeast proteins', *Yeast*, 28(7), pp. 505–526. Available at: <https://doi.org/10.1002/yea.1854>.
 46. Ohhashi, Y. *et al.* (2018) 'Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), pp. 2389–2394. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1715483115>.
 47. Ortega-Cubero, S. *et al.* (2013) 'Neuroimagen estructural y funcional en las enfermedades priónicas humanas', *Neurología*, 28(5), pp. 299–308. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.03.012>.
 48. Parry, W.H., Martorano, F. and Cotton, E.K. (1976) 'Management of life-threatening asthma with intravenous isoproterenol infusions', *American Journal of Diseases of Children (1960)*, 130(1), pp. 39–42. Available at: <https://doi.org/10.1001/archpedi.1976.02120020041006>.
 49. Petrović, Z.D. *et al.* (2012) 'Antimicrobial activity of the ionic liquids triethanolamine acetate and diethanolamine chloride, and their corresponding Pd(II) complexes', *Journal of Molecular Liquids*, 170, pp. 61–65. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.03.009>.
 50. Pirkkala, L., Nykänen, P. and Sistonen, L. (2001) 'Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond', *The FASEB Journal*, 15(7), pp. 1118–1131. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj00-0294rev>.
 51. Rainsford, K.D. (1975) 'The biochemical pathology of aspirin-induced gastric damage', *Agents and Actions*, 5(4), pp. 326–344. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02205240>.

52. Reith, W. (2018) 'Neurodegenerative Erkrankungen', *Der Radiologe*, 58(3), pp. 241–258. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00117-018-0363-y>.
53. Safar, J. *et al.* (1998) 'Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations', *Nature Medicine*, 4(10), pp. 1157–1165. Available at: <https://doi.org/10.1038/2654>.
54. Sharma, J. *et al.* (2017) 'De novo [PSI⁺] prion formation involves multiple pathways to form infectious oligomers', *Scientific Reports*, 7(1), p. 76. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00135-6>.
55. Sherman, F. (2002) 'Getting started with yeast', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 3–41. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X).
56. Shim, K.H., Sharma, N. and An, S.S.A. (2022) 'Prion therapeutics: Lessons from the past', *Prion*, 16(1), pp. 265–294. Available at: <https://doi.org/10.1080/19336896.2022.2153551>.
57. Solforosi, L. *et al.* (2013) 'A closer look at prion strains: Characterization and important implications', *Prion*, 7(2), pp. 99–108. Available at: <https://doi.org/10.4161/pri.23490>.
58. Speldewinde, S.H. *et al.* (2017) 'Disrupting the cortical actin cytoskeleton points to two distinct mechanisms of yeast [PSI⁺] prion formation', *PLOS Genetics*. Edited by H.L. True, 13(4), p. e1006708. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006708>.
59. Stott, W.T. (2004) 'Evaluation of the Potential of Triethanolamine to Alter Hepatic Choline Levels in Female B6C3F1 Mice', *Toxicological Sciences*, 79(2), pp. 242–247. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh115>.
60. Uchiyama, K. *et al.* (2021) 'Ethanolamine Is a New Anti-Prion Compound', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), p. 11742. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222111742>.
61. Vance, J.E. and Tasseva, G. (2013) 'Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), pp. 543–554. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.016>.
62. Wickner, R., Son, M. and Edskes, H. (2019) 'Prion Variants of Yeast are Numerous, Mutable, and Segregate on Growth, Affecting Prion Pathogenesis, Transmission Barriers, and Sensitivity to Anti-Prion Systems', *Viruses*, 11(3), p. 238. Available at: <https://doi.org/10.3390/v11030238>.
63. Ziaunys, M., Sneideris, T. and Smirnovas, V. (2020) 'Formation of distinct prion protein amyloid fibrils under identical experimental conditions', *Scientific Reports*, 10(1), p. 4572. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61663-2>.

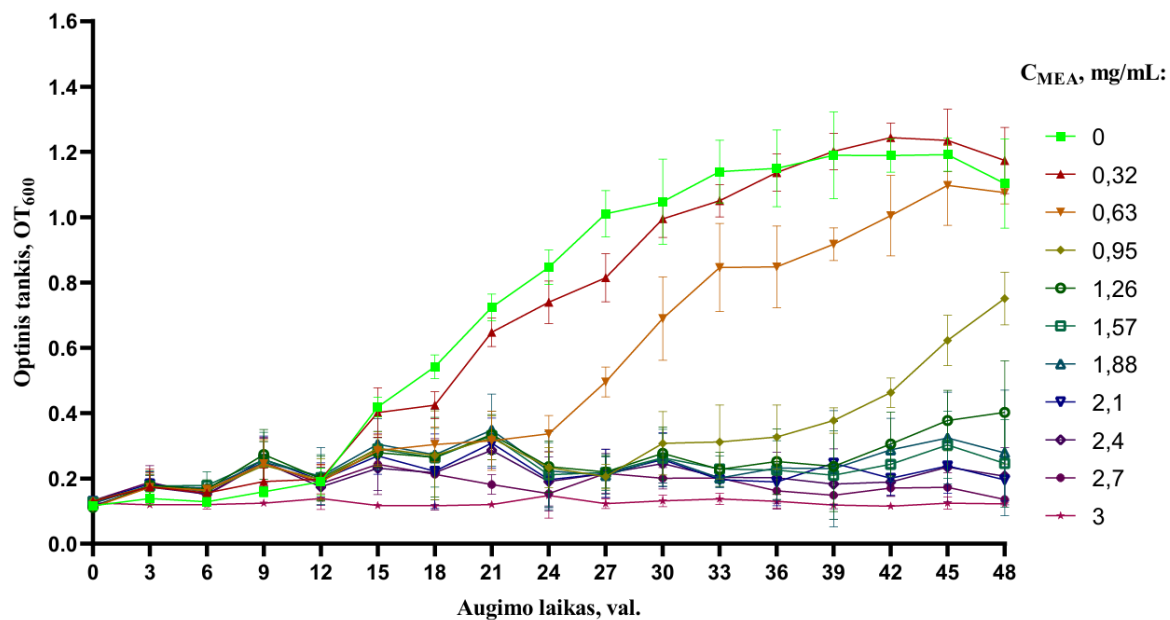
PRIEDAI

1 priedas

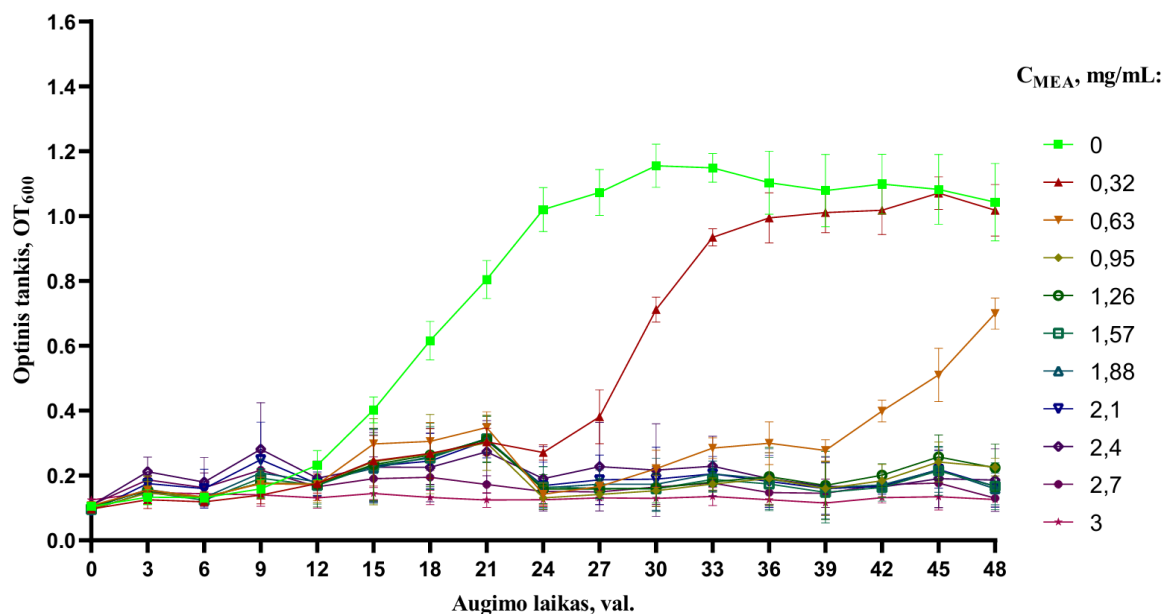
1.1 lentelė. Etanolaminų cheminė formulė, struktūra ir molinė masė (pagal [1] 2-aminoethanol | C₂H₇NO, 2023; [2] 2,2'-Iminodiethanol | C₄H₁₁NO₂, 2023; [3] 2,2',2''-Nitrilotriethanol | C₆H₁₅NO₃, 2023).

Etanolaminų IUPAC pavadinimai	Cheminė formulė	Etanolamino struktūra	Molekulinė masė, g/mol	Šaltinis
2-aminoetanolis	C ₂ H ₇ NO		61,084	[1]
2,2'-aminodietanolis	C ₄ H ₁₁ NO ₂		105,137	[2]
2,2',2''-nitrilotrietanolis	C ₆ H ₁₅ O ₅		149,19	[3]

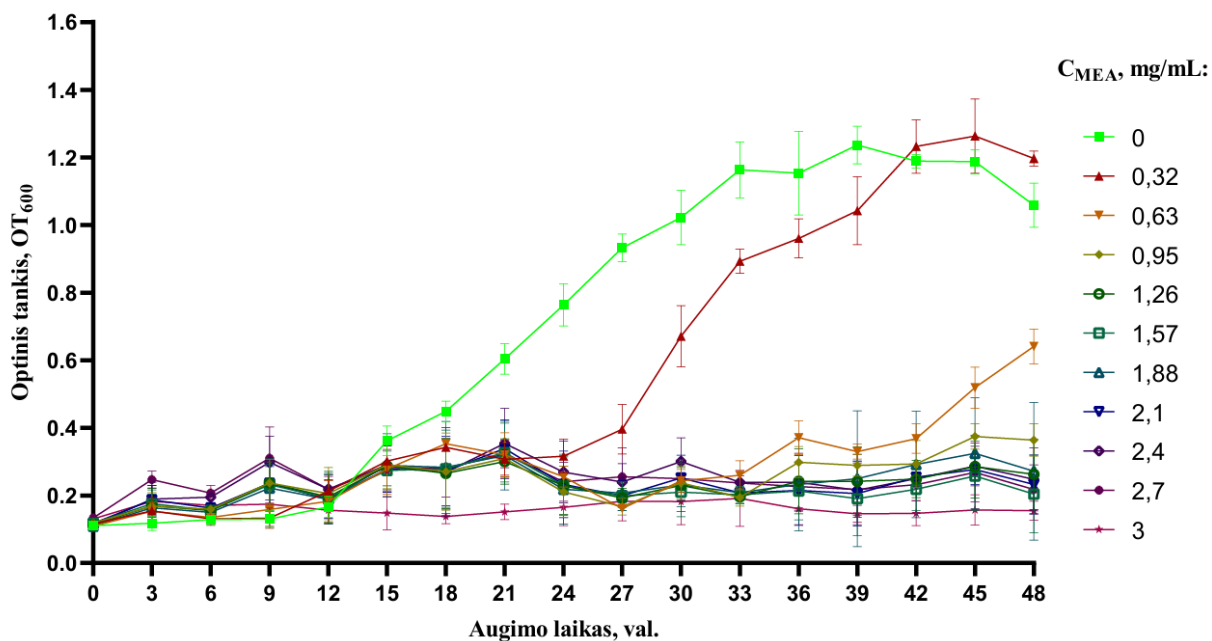
2 priedas



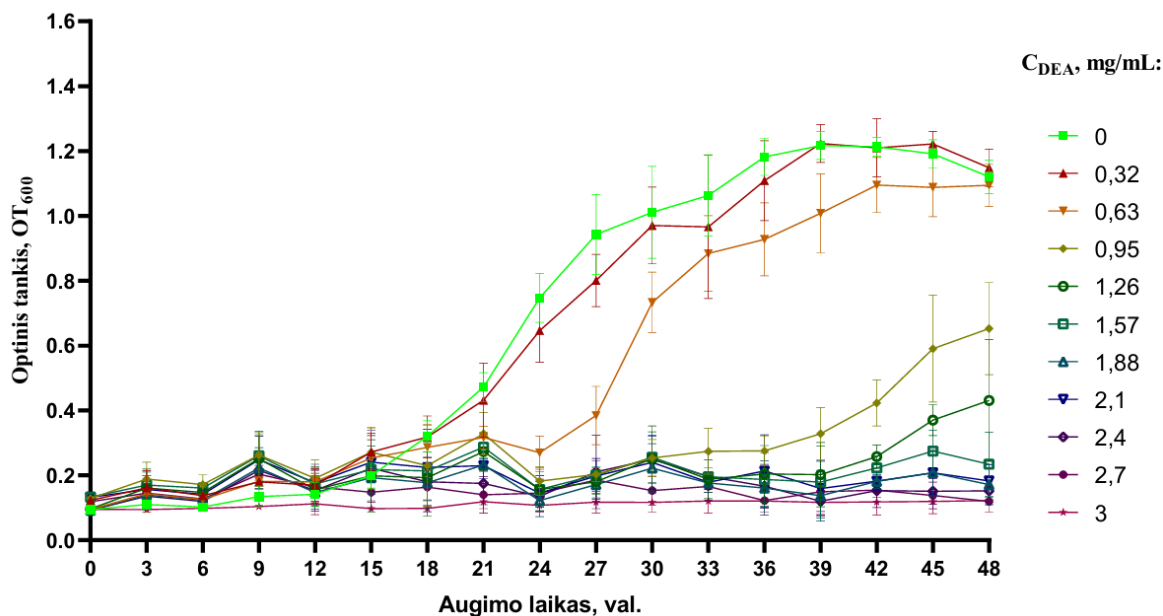
2.1 pav. Pirmasis *S. cerevisiae* 74D-694 [psi⁻] ląstelių auginimas, atliktas su didesnėmis monoetanolamino (MEA) koncentracijomis. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± standartinė paklaida.



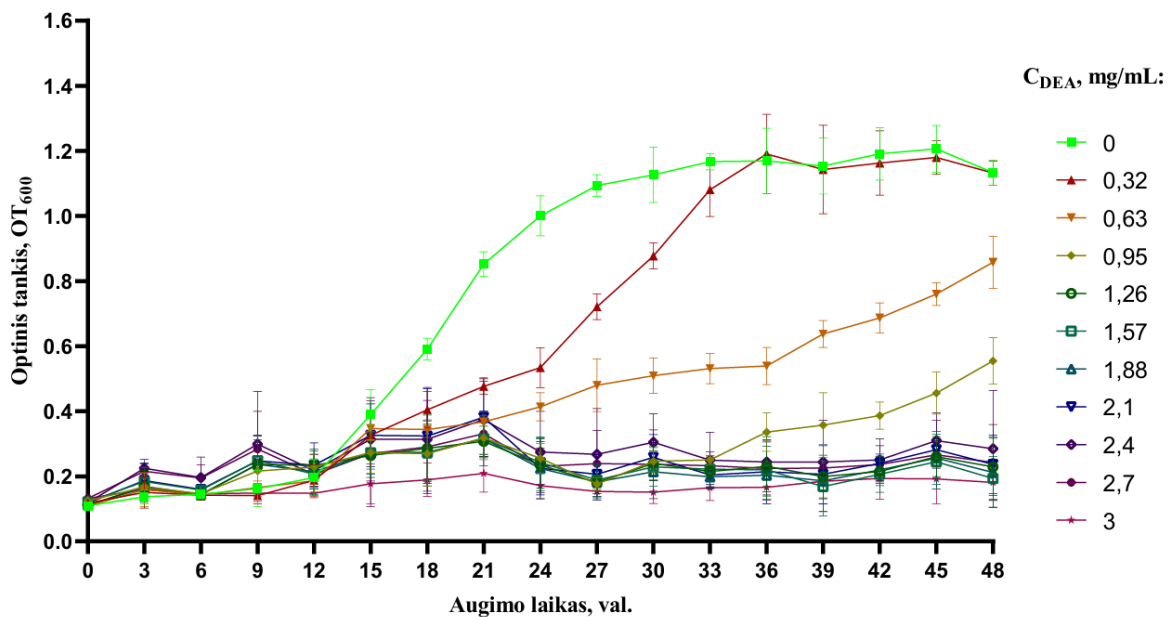
2.2 pav. Pirmasis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W ląstelių auginimas, atliktas su didesnėmis monoetanolamino (MEA) koncentracijomis. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida.



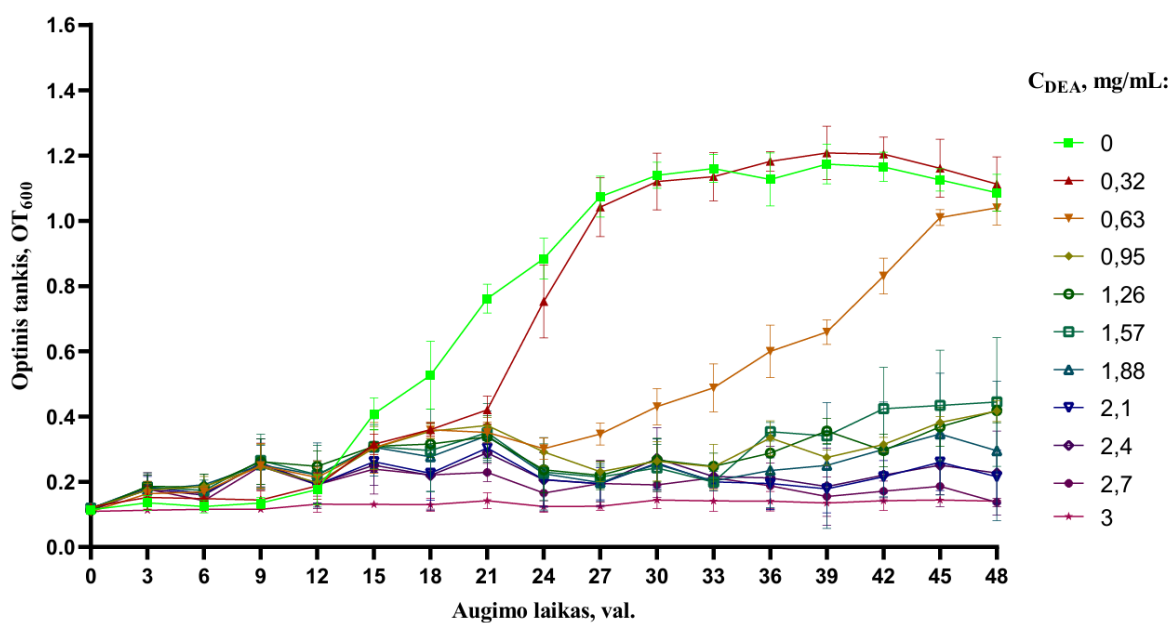
2.3 pav. Pirmasis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^S ląstelių auginimas, atliktas su didesnėmis monoetanolamino (MEA) koncentracijomis. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida.



2.4 pav. Pirmasis *S. cerevisiae* 74D-694 [*psi*⁻] ląstelių auginimas, atliktas su didesnėmis dietanolamino (DEA) koncentracijomis. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± standartinė paklaida.



2.5 pav. Pirmasis *S. cerevisiae* 74D-694 [*PSI*⁺]^W ląstelių auginimas, atliktas su didesnėmis dietanolamino (DEA) koncentracijomis. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai ± standartinė paklaida.



2.6 pav. Pirmasis *S. cerevisiae* 74D-694 [PSI^+]^S ląstelių auginimas, atliktas su didesnėmis dietanolamino (DEA) koncentracijomis. Nurodyti ląstelių optinio tankio vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida.