

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos magistro studijų programos studentė

Rūta DULKYTĖ

Baigiamasis magistro darbas

***Saccharomyces cerevisiae* L-A-1 viruso kapsidžių transfekcinio pajėgumo
žinduolių ląstelėse HCT116 vertinimas**

Darbo vadovas:

Prof. dr. Saulius Serva

Vilnius, 2020 m.

***Saccharomyces cerevisiae* L-A-1 viruso kapsidžių transfekcinio pajėgumo žinduolių
ląstelėse HCT116 vertinimas**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos ir molekulinės
biologijos katedroje, Nukleorūgščių biochemijos laboratorijoje

Rūta Dulkytė

/parašas/

Darbo vadovai:

Leisti / neleisti gintis:

Prof. dr. Saulius SERVA
Įrašo data

/parašas/

TURINYS

| | |
|--|----|
| SANTRUMPOS | 5 |
| ĮVADAS | 7 |
| 1 LITERATŪROS APŽVALGA | 8 |
| 1.1 Mielės <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| 1.1.1 Praktinė mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> reikšmė..... | 8 |
| 1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virusai | 10 |
| 1.2.1 Virusų reikšmė kilerinėse mielėse | 11 |
| 1.2.2 Virusų palaikymas mielių ląstelėse | 11 |
| 1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L-A virusas | 13 |
| 1.3.1 L-A replikacijos ciklas..... | 14 |
| 1.3.2 L-A virusų genomai | 15 |
| 1.3.3 L-A viruso kapsidė | 17 |
| 1.3.4 L-A viruso baltymų formuojamos VLP..... | 18 |
| 1.4 Pseudoviriono dalelės | 18 |
| 1.4.1 VLP raiškos sistemos | 20 |
| 1.5 VLP panaudojimas | 21 |
| 1.5.1 VLP pagrindu sukurtos vakcinos..... | 22 |
| 1.5.2 VLP pernašos sistemos | 22 |
| 2 MEDŽIAGOS IR METODAI | 24 |
| 2.1 Medžiagos..... | 24 |
| 2.1.1 Terpės | 24 |
| 2.1.2 Tirpalai ir buferiai..... | 24 |
| 2.1.3 Reagentai | 24 |
| 2.1.4 Dažai..... | 25 |
| 2.2 Mielių <i>S. cerevisiae</i> kamienai..... | 25 |
| 2.3 Eukariotinės ląstelės | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.4 Įranga | 27 |
| 2.5 Programinė įranga..... | 27 |
| 2.6 Metodai..... | 27 |
| 2.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kultivavimas ir biomasės surinkimas..... | 27 |
| 2.6.2 Mielių biomasės ardymas stiklo rutuliukais | 27 |
| 2.6.3 L-A-1 viruso komponentų gryninimas | 28 |
| 2.6.4 Baltyminių mėginių paruošimas ir elektroforezė | 29 |
| 2.6.5 Baltymo kiekio ir koncentracijos nustatymas..... | 30 |
| 2.6.6 HCT116 ląstelių kultivavimas ir gyvybingumo vertinimas | 30 |
| 2.6.7 Doksorubicino citotoksiškumo vertinimas | 31 |
| 2.6.8 HCT116 gyvybingumo vertinimas | 31 |
| 2.6.9 Dox patekimo į HCT116 ląsteles vertinimas stebint Dox fluorescenciją..... | 32 |
| 3 REZULTATAI | 33 |
| 3.1 Virusinių kapsidžių gryninimas ir L-A-1 viruso komponentų citotoksiškumo tyrimas | 33 |
| 3.2 Didesnio virusinių kapsidžių kiekio gryninimas | 35 |
| 3.3 Virusinių kapsidžių gryninimo būdų palyginimas..... | 40 |
| 3.4 L-A-1 viruso VLP transfekcinio pajėgumo vertinimas | 42 |
| 4. REZULTATŲ APTARIMAS | 45 |
| IŠVADOS | 45 |
| Santrauka | 47 |
| Summary..... | 48 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 49 |
| PADĖKA | 54 |

SANTRUMPOS

AA:BIS – akrilamidas: bisakrilamidas

APS – amonio persulfatas

bp – bazių pora

BSA – jaučio serumo albuminas (angl. bovine serum albumin)

dgRNR – dvigrandininė RNR

DTT – ditionitritolis

EDTA - etilendiamino-tetraacetato rūgštis

FBS – fetalinis veršelio serumas (angl. fetal bovine serum)

FDA – maisto ir vaistų administracija (angl. food and drug administration)

Gag – *Saccharomyces cerevisiae* L-A viruso kapsidės baltymas

GMP – guanozin-5'-fosfatas

GRAS – visuotinai pripažintas saugiu (angl. generally recognized as safe)

YPD – turtinga mielių auginimo terpė (angl. yeast extract peptone dextrose medium)

kb – kilobazė (1000 bp)

MAK – kilerinių genų palaikymo sistema (angl. for maintenance of killer)

PAG – poliakrilamido gelis

PMSF – proteazių inhibitorius (angl. phenylmethanesulfonyl fluoride)

RPMI – eukariotinių ląstelių kultivavimo terpė (angl. Roswell Park Memorial Institute)

SDS – natrio dodecilsulfatas

SKI – superkilerinių genų sistema (angl. super killer)

TEMED – tetrametilendiaminas

Tris – 2-amino-2-propan-1,3-diolis

vgRNR – viengrandininè RNR

VLP – pseudoviriono dalelès (angl. virus-like particles)

WT – laukinis tipas (angl. wild type)

ĮVADAS

Saccharomyces cerevisiae – tai viena naudingiausių mielių rūšių, plačiai naudojamų įvairiems tikslams visu žmogaus civilizacijos laikotarpiu. *S. cerevisiae* jau tūkstančius metų naudojamos kepinimui, alaus ir vyno gamyboje (Landry *et al.*, 2006). Tai – vienas pirmųjų organizmų, kuris maisto ir vaistų administracijos FDA (angl. Food and Drug Administration) buvo visuotinai pripažintas saugiu – GRAS (angl. generally recognized as safe) organizmu (Türker, 2014). Atliekant žmogaus mikrobiomo tyrimus nustatyta, kad sveikų žmonių žarnyne *S. cerevisiae* mielės yra natūralios mikrofloros dalis (Nash *et al.*, 2017). Dėl šių priežasčių *S. cerevisiae* taip pat naudojamos ir medicinos pramonėje, kuriant įvairius preparatus (Türker, 2014).

Daugumoje mielių kamienų yra randamas L-A virusas, priklausantis *Totiviridae* šeimos virusams. Tai vieno segmento 4,6 kb dgRNR virusas, kuris pastoviai palaikomas mielėse ir nedaro neigiamos įtakos jų gyvybingumui. L-A virusai koduoja kapsidės baltymą Gag ir sulietą baltymą Gag-Pol, kuris sintetinamas dėl -1 ribosomos rėmelio poslinkio (Wickner, 2013). Įrodyta, kad Gag bei Gag-Pol baltymai geba savarankiškai susirinkti ir suformuoti apibrėžtos sferinės simetrijos struktūras – pseudoviriono daleles VLP *in vivo* (Fujimura *et al.*, 1992). L-A viruso VLP mielių ląstelėse gaminamos dideliais kiekiais, be to dėl savo struktūros ir molekulinės masės, VLP gali būti nesunkiai išgryninamos. Nustatyta, kad tokios VLP gerai toleruoja svetimų aminorūgščių įterpimą ir tai nedaro įtakos savarankiškam šių dalelių susirinkimui *in vivo*. Todėl mielių totiviruso L-A baltymai gali būti pritaikomi kaip potenciali platforma įvairių vakcinų bei nano-nešiklių kūrimui (Powilleit, 2007).

Darbo tikslas:

Įvertinti L-A-1 viruso kapsidžių, išskirtų iš *Saccharomyces cerevisiae* mielių, transfekcinį potencialą HCT116 ląstelėse.

Darbo uždaviniai:

- 1) Išgryninti *Saccharomyces cerevisiae* L-A-1 viruso VLP.
- 2) Įvertinti L-A-1 viruso komponentų citotoksiškumą HCT116 ląstelėms.
- 3) Įvertinti L-A-1 viruso VLP transfekcinį pajėgumą HCT116 ląstelėse.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Mielės *Saccharomyces cerevisiae*

Mielės yra vienaląstis eukariotinis organizmas, kurio dauguma fundamentalių ląstelės funkcijų, tokių kaip proliferacija, ląstelės ciklo reguliacija, ląstelinis transportas ar programuota žūtis yra konservatyvios ir labai panašios į aukštesniųjų eukariotų (Zhao, 2017). *S. cerevisiae* turi 16 chromosomų porų, o jų genomo dydis siekia apie 1,2 mln. bp. Jos turi apie 5700 baltymus koduojančių genų, kurių 4,4 % turi intronus (Kupfer *et al.*, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* priklauso grybų karalystei, *Ascomycota* tipui – jos gamina askoporas mejozės metu. Taip pat *Saccharomyces cerevisiae* vadinamos pumpuruojančiomis mielėmis, kadangi nelytinio dauginimosi metu mažesnė dukterinė ląstelė susiformuoja ir atsipumpuruoja nuo motininės ląstelės (Zhao, 2017). Jei vyksta lytinis dauginimasis, vegetatyvinės ląstelės formuoja askoporas. Mejozės metu susidaro keturios askosporos. Šios askosporos sudygsa, sudarydamos haploidinius kamienus. Norint grįžti į diploidinę būseną, tarp haploidinių ląstelių turi įvykti poravimasis (Herskowitz, 1988). Haploidinės ir diploidinės fazės yra morfologiškai panašios, tačiau diploidinės ląstelės yra didesnės. *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės paprastai yra pailgos sferoidinės formos su iškilia centrine vakuole ir mažu branduoliu. Mielių sienelę sudaro β 1,3- ir β 1,6-gliukanai, nedidelis kiekis chitino ir daug skirtingų baltymų (Orlean, 2012). Mielės yra heterotrofai, pagrindinis jų energijos šaltinis yra gliukozė. Kai aplinkoje yra pakankamai gliukozės, mielės vykdo anaerobinį gliukozės skaidymą, vadinamą fermentacija (Kayikci ir Nielsen, 2015).

1.1.1 Praktinė mielių *Saccharomyces cerevisiae* reikšmė

Mielės visame pasaulyje jau tūkstančius metų naudojamos vyno, alaus ir duonos gamyboje. Nustatyta, jog seniausias rastas vynas yra daugiau nei 7 000 metų senumo. Azijoje, Europoje bei Artimuosiuose Rytuose mielės midaus gamyboje buvo pradėtos naudoti maždaug 1 700 - 1 100 metų pr. Kr. Egipte, Babilone ir Romoje bei Kinijoje mielės buvo naudojamos vyno gamybai iš vynuogių ir alaus gamybai iš salyklinių miežių. Pietų Amerikoje buvo gaminama Čiča (isp. chicha) – braziliškas putojantis gėrimas iš kukurūzų, ryžių, manijokų ir palmių vaisių, o Šiaurės Amerikoje buvo gaminamas fermentuotas alkoholinis gėrimas iš raugintų agavos sulčių (isp. pulque, octil) (Alba-Lois ir Segal-Kischeinevzky, 2010). Fermentacijos procesą pradėjo nagrinėti Louis Pasteur (1822 - 1895 m.), kuris tyrinėdamas vyno ir alaus fermentaciją 1876 metais savo darbuose paskelbė, jog cukrus verčiamas etanoliu dėl mikroorganizmų veiklos. Pasteur taip pat

pristatė aseptinių sąlygų ir grynų kultūrų koncepciją, kuri padėjo išspręsti „blogos“ fermentacijos problemą ir apibrėžė skirtumus tarp alkoholinės fermentacijos ir aerobinio mielių augimo. *S. cerevisiae* kultūros buvo išgrynintos jau 1888 metais Emil Christian Hansen iš alaus daryklos „Carlsberg“ Kopenhagoje ir 1890 m. vokiečio Müller-Thurgau Geisenheime. Emil Fischer ir Eduard Büchner su bendraminčiais pradėjo gilintis į mielių ląstelėse vykstančius metabolinius procesus, kas paskatino išsamius mielių biochemijos ir metabolizmo tyrimus bei pagrindinius atradimus biochemijoje ir ląstelių biologijoje (Johnson ir Echavarri-erasun, 2011).

Šiais laikais visame pasaulyje rasta ir identifikuota tūkstančiai *Saccharomyces cerevisiae* kamienų. Šių tyrimų metu nustatyta, jog mielės pasižymi aukšta genetinė įvairove, o kai kurie mielių kamienai randami tik labai specifiniuose regionuose (Legras *et al.*, 2007). Tradiciškai fermentacijos procesuose naudojamos *Saccharomyces cerevisiae* mielės, kurių skirtingi kamienai naudojami maisto pramonėje paprasčiausiai vadinami kepimo, alaus ar vyno mielėmis (Landry *et al.*, 2006). *S. cerevisiae* FDA reglamentuose nurodomos kaip GRAS (angl. generally recognized as safe) organizmas ir nurodoma, kad jas galima naudoti kaip priedą, tiesiogiai dedamą į žmonėms skirtą maistą (Maheshwari, Dubey ir Saravanamurthu, 2010).

2007 metais pradėto žmogaus mikrobiomo projekto metu buvo nustatyta, jog mielės *Saccharomyces cerevisiae* yra dažniausiai žmogaus žarnyne randamas grybas. 96,8 % sveikų žmonių išmatų mėginiuose buvo rasta *Saccharomyces* genties mieliagrybių. Tai rodo, jog šios mielės yra natūralios žmogaus mikrofloros dalis (Nash *et al.*, 2017). Taip pat nustatyta, jog *Saccharomyces cerevisiae* mielės yra naudingos žmogaus sveikatai: *S. cerevisiae*, naudojamos maisto ir gėrimų fermentacijos procesuose pasižymi probiotinėmis savybėmis. Pavyzdžiui, *S. cerevisiae* var. *Boulardii* geba prisijungti prie enteropatogenų ir tokiu būdu slopina bakterijų adheziją ir migraciją žarnyno epitelium, o šių mielių gaminama serino proteazė karpą *Clostridium* bakterijų toksinus A ir B. *S. cerevisiae* pasižymi priešuždegiminiu efektyvumu: per peroksisomų proliferacijos aktyvuojamą receptorių gama (PPAR- γ) mielės geba sumažinti žmogaus žarnyno ląstelių atsaką į uždegiminius citokinus. Sąveikaudamos su šeimininko ląstelių signaliniais keliais, sumažina uždegimą bakterinių infekcijų metu (Farid *et al.*, 2019).

S. cerevisiae genomas buvo pirmasis nusekvenuotas eukariotinis genomas (Goffeau *et al.*, 1996) ir šiandien jis vis dar yra kruopščiausiai apibūdinamas, o sukauptos žinios

plačiai panaudojamos (Johnson ir Echavarri-erasun, 2011). *S. cerevisiae* yra vienas iš modeliųjų organizmų, kuris suteikė daug žinių apie eukariotinėse ląstelėse vykstančius procesus. Šios mielės naudojamos tiriant įvairius žmogaus genus ir gilinant sistemų biologijos žinias (Landry *et al.*, 2006). Mielės neturi toksinių antrinių metabolitų, todėl plačiai naudojamos heterologinių fermentų ir kitų baltymų gamyboje maisto bei medicinos pramonėje. *S. cerevisiae* mielės naudingos kuriant įvairias vakcinas ar kitus medicininius preparatus (Money, 2015). Insulinas, gautas iš *S. cerevisiae*, pasižymi didesniu farmakologiniu efektyvumu ir mažesniu šalutiniu poveikiu, nei kiaulių insulinas. Taip pat šios mielės naudojamos α -interferono, epidermio augimo faktoriaus, žmogaus serumo albumino, hepatito B paviršiaus antigeno, β -endorfino, prochimozino ir epidermio augimo faktoriaus gamyboje (Melmer, 2005). Mielės naudojamos ir kai kurių cheminių junginių sintezei, pavyzdžiui, L-pieno rūgšties, taip pat kai kurių aminorūgščių produkcijoje, pavyzdžiui, lizino, metionino, fenilalanino ir prolino. *S. cerevisiae* naudojamos ir glicerolio gamyboje fermentuojant etanolį osmosinio šoko sąlygomis, bei kai kurių vitaminų produkcijoje (Johnson ir Echavarri-erasun, 2011). Taip pat mielės pasižymi įvairių naudingų antrinių metabolitų produkcija (metil-benzoatas, fenetilo alkoholis – naudojami maisto ir parfumerijos pramonėje). Šias mieles bandoma pritaikyti bioremediacijos procesuose ir biodegalų gamyboje (Money, 2015).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* virusai

Mielių virusai – tai (+) dvigrandininės RNR (dgRNR) ir (+) viengrandininės RNR (vgRNR) bei DNR virusai. Pumpuruojančioms mielėms priklauso trys dgRNR virusų šeimos – tai L-A su L-BC ir M bei dvi vgRNR virusų šeimos – tai T ir W (Zhao, 2017). Gerai žinomi du *Saccharomyces cerevisiae* dgRNR L-A ir L-BC virusai, kurie skiriasi savo struktūra bei funkcionalumu. Dauguma mielių kamienų turi vieną ar abu šiuos virusus, kurie stabiliai replikuojasi mielių ląstelėse. Nustatyta, kad virusų replikacija mielėse nedaro jokios neigiamos įtakos mielių augimui ir gyvybingumui. Tai rodo viruso ir jo šeimininko pusiausvyrą (Wickner, 1996). L-BC, kaip ir L-A, yra 4,6 kb dg RNR virusai, kuriems priklauso L-B ir L-C virusai. Nors L-BC ir L-A virusai yra artimai susiję, L-BC virusų skaičius mielių ląstelėse yra mažesnis (Ribas ir Wickner, 1996). Šių mielių dgRNR virusai panašūs į žinduolių dgRNR virusus, o vgRNR virusų sekos labai panašios į kai kurias RNR bakteriofagų sekas (Wickner, 2013). *Saccharomyces cerevisiae* M virusai yra defektyvūs ir randami ląstelėse tik kartu su L-A virusais. M virusai mielėms suteikia biocidinį fenotipą ir tokios mielės vadinamos kilerinėmis mielėmis (El-sherbeini ir

Bostian, 1987). Mielės turi retrotranspozonų elementų, randamų ir kituose grybuose. Išskiriamos penkios mielių retrotranspozonų šeimos: Ty1, Ty2, Ty3, Ty4, Ty5. *Saccharomyces cerevisiae* yra dažniausiai naudojamas organizmas tiriant mielių virusus (Zhao, 2017).

1.2.1 Virusų reikšmė kilerinėse mielėse

Mielių dgRNR ir vgRNR virusai gali infekuoti kitas mielių ląsteles ir taip plisti iš ląstelės į ląstelę. Infekcijos atveju mielės, turinčios šiuos virusus, nužudo infekuojamas mieles ir yra vadinamos kilerinėmis mielėmis. Kilerinės mielės sekretuoja baltyminius toksinus (K1, K2, K28 ir Klus), vadinamus zimociniais, letalius nekilerinių mielių kamienams (Zhao, 2017). Toksinai mielių ląstelėse sintetunami kaip vienas polipeptidinis preprotoksinas, susidedantis iš hidrofobinių aminorūgščių. Skirtingų toksinų preprotoksinų struktūra yra panaši. Susintetintas preprotoksinas pereina potransliacines modifikacijas endoplazminiame tinkle ir Goldžio aparate ir sekretuojamas į aplinką vezikulių pagalba. Į aplinką sekretuojamas subrendęs ir aktyvus toksinas (EL-Banna, El-sahn ir Shehata, 2011). Šie toksinai sukelia jautrių (nekilerinių) mielių nekrozę ar apoptozę (Zhao, 2017). Geriausiai išnagrinėti yra K1, K2 ir K28 toksinai. Toksinas K1 (19 kDa) sutrikdo plazminės membranos funkcijas, formuodamas katijonams selektyvius jonų kanalus. K2 toksinas veikia panašiai: sutrikdoma jautrių mielių plazminės membranos struktūra ir sukeliama ląstelės žūtis (Orentaite *et al.*, 2016). K28 toksinas patenka į mielių ląsteles receptorinės endocitozės būdu ir veikia blokuodamas DNR sintezę ir mielių pumpuravimosi ciklą (EL-Banna, El-sahn ir Shehata, 2011). Klus toksino veikimo mechanizmas kol kas dar nėra išaiškintas (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). Tačiau šie toksinai neveikia bakterijų ar kitų organizmų.

Kilerinių mielių kamienuose randami du dgRNR virusai – *Saccharomyces cerevisiae* L-A virusas (ScV-LA) ir M virusas (ScV-M). Žinoma, kad žudymo efektas pasiekiamas tik kamiene kartu esant ScV-LA ir ScV-M virusams. ScV-LA yra pagalbinis virusas, kuris koduoja kapsidės baltymus, naudojamus abiejų virusų, o toksinai yra koduojami skirtingo palydovinio ScV-M viruso. Tai reiškia, kad esant ScV-M virusui būtinas ScV-LA virusas norint, kad mielė išgyventų (Zhao, 2017).

1.2.2 Virusų palaikymas mielių ląstelėse

Norint išlaikyti stabilų kilerinį fenotipą, didžiausią vaidmenį atlieka mielių ląstelės chromosomos genai. Be chromosominių SEC genų, reikalingų ekstraląstelinių baltymų bei

glikoproteinų sekrecijai, taip pat įtakos turi KEX koduojama proteazė Kex2p ir Kex1p. Šios proteazės atsakingos už preprotoksino apdorojimą ir jo pirmtako brendimą. Yra ir daugiau mielių chromosomos genų, kurie tiesiogiai ar netiesiogiai sąlygoja virusų kiekį ląstelėje. Šie genai gali būti suskirstomi į dvi pagrindines grupes: 1) kilerinių genų palaikymo sistema MAK (angl. for maintenance of killer); 2) superkileriniai genai, SKI sistema (Schmitt ir Frank, 2002). *Mak* mutantai nepalaiko M1 (ar M2), todėl mielių kamienai yra nekileriniai. Tik trys *mak* mutantai taip pat praranda L-A virusą: *mak3*, *mak10* ir *mak31* (Rodriguez-Cousino, Gomez ir Esteban, 2013). *MAK3* genas koduoja N-acetiltransferazę, kuri atsakinga už struktūrinio virusų baltymo Gag N-galo acetilinimą. Be šios acetilinimo reakcijos, Gag baltymai negali savarankiškai susirinkti ir tai lemia dgRNR virusų kiekio sumažėjimą mielių ląstelėse. *Mak10p* genas reikalingas ląstelių augimui ant nefermentuojamų anglies šaltinių bei stabilizuoja virusines daleles, ypač turinčias dgRNR. *PET18* geno produktai lemia bendrą viriono stabilumą, spėjama, kad tai vyksta per *Pet18p* ir virusinių dalelių sąveiką. Tuo tarpu mutacijos bent viename iš chromosomos SKI genų fenotipiškai slopina *mak* mutacijas dgRNR virusus turinčiuose mielių kamienuose. Taip vadinamieji superkileriniai genai *SKI* pirmiausia buvo identifikuoti tiriant mutacijas, kurios lėmė padidintą kilerinių toksinų raišką mielėse. SKI genai mielių ląstelėse atlieka antivirusinę funkciją sumažindami viruso skaičių ląstelėje ir slopindami polyA neturinčios iRNR raišką, taip pat slopindami L-A ir M virusų replikaciją, kadangi šie virusai neturi 3' polyA ir 5' kepurės struktūrų. Yra nustatyta, jog norint slopinti poly-A uodegos transliaciją RNR grandinėse, reikalingi penki iš šešių mielių SKI sistemos genai: *SKI2*, *SKI3*, *SKI6*, *SKI7* ir *SKI8*, kur *SKI1* koduoja 5P-egzoribonukleazę, kuri reikalinga bendrai RNR degradacijai. *SKI2* koduoja RNR helikazių šeimos baltymus, *Ski3p* yra nukleoproteinai ir kartu su *Ski8p* šie baltymai formuoja kompleksą, kuris veikia kaip RNR helikazė ir kaip kofaktorius kai kurių egzosomų kompleksams sąveikoje su *Ski7p*. *Ski6p* įeina į egzosomos komplekso sudėtį ir veikia degraduojant iRNR. Nustatyta, kad *ski2*, *ski3* ir/arba *ski8* genų mutacijos neslopina polyA uodegos neturinčių iRNR grandinių transliacijos. Taip pat *Ski* baltymai atlieka ir kitas bendresnes ląstelės funkcijas, tokias kaip iRNR stabilumo palaikymas ir degradacija (Schmitt ir Frank, 2002).

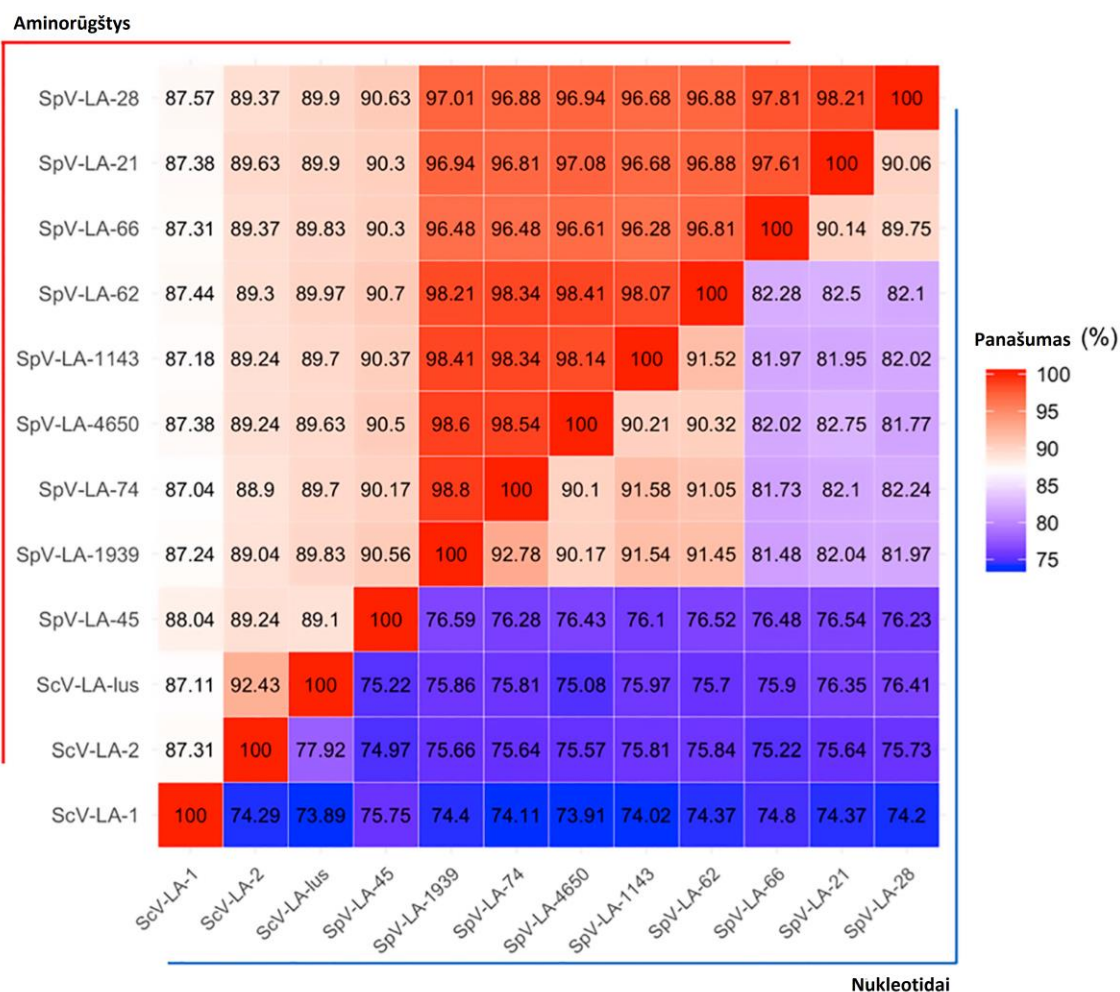
Nustatyta, jog mitochondrijų genai, tokie kaip *NUC1*, kuris koduoja mitochondrijų nukleazę, bei *POR1*, kuris koduoja mitochondrijų poriną, taip pat dalyvauja L-A viruso kiekio reguliacijoje mielių ląstelėse. *POR1* – nuo krūvio priklausomas išorinės mitochondrijų membranos jonų kanalo baltymas. Jo delecija lemia padidėjusią Gag

baltymo produkciją mielių ląstelėse. Mechanizmas, kuriuo NUC1 ir POR1 mutantuose gaunamas padidintas kiekis L-A virusų, nėra iki galo aiškus. Manoma, jog mitochondrijų funkcijos daro įtaką virusinių dalelių gamybai mielių ląstelėse (Torres, 2019).

1.3 *Saccharomyces cerevisiae* L-A virusas

L-A virusas priklauso *Totiviridae* virusams. Tai 4,6 kb vieno segmento dgRNR virusas. Manoma, kad šis virusas yra stabiliai palaikomas ląstelėje ir nedaro neigiamos įtakos jų augimui (Wickner, Fujimura ir Esteban, 2013). Krioelektroninės mikroskopijos metodu išsiaiškinta, kad L-A virusas yra ikosaedrinis ir pasižymi T = 1 simetrija (Wickner, 1996).

Yra rasta keletas įvairių L-A virusų, pavyzdžiui, ScV-LA-1, ScV-LA-2, ScV-LA-28 ir ScV-LA-lus, kurių nukleotidų sekų panašumas yra 74 %. Atlikus tyrimą, kurio metu buvo lyginami skirtingi *S. cerevisiae* ir *Saccharomyces paradoxus* mielių L-A virusų variantai nustatyta, kad šių virusų panašumas aminorūgščių lygmenyje yra didesnis. Kapsidės baltymų Gag panašumas siekia 88 – 99 %, o sulietinio baltymo Gag-Pol panašumas yra 87 – 98 %. (1 pav.) (Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018). L-A-2 ir L-A-lus virusai pasižymi didžiausiu dgRNR panašumu, kuris siekia 78%. L-A virusas *S. cerevisiae* Klus mielių kamiene skiriasi nuo K1 kamieno viruso ar daugumos kitų, nekilerinių laboratorinių mielių kamienų virusų. Taip pat ir K2 virusas vyno mielių kamiene: remiantis „fingerprinting“ analize ir dalinio sekvenavimo metodu, rastas L-A viruso variantas L-A-2, kurio pagalbinis virusas taip pat skiriasi nuo L-A-1 viruso. Dar vienas variantas yra L-A-lus virusas, kuris stabiliai palaikomas vyno mielių kamienuose. Šiuo metu yra pilnai nusekvenotas ir kito varianto – L-A-28 viruso genomas, kuris skiriasi 24 % nuo L-A, L-A-lus ar L-A-2 virusų genomų. Skirtingi L-A virusų variantai pasižymi ir skirtingomis fenotipinėmis savybėmis. L-A virusai labiau jautrūs aukštesnėms temperatūroms (37 - 39°C) nei L-A-lus ar L-A-2 virusai bei gali būti lengvai pašalinamas iš ląstelės šeimininkės. Padidinta *SKII* geno koduojamos egzonukleazės raiška lengvai pašalina L-A virusą iš mielių ląstelių, tačiau L-A-lus ir L-A-2 virusams tokios įtakos neturi. Taip pat tyrimais parodyta, kad pats L-A virusas yra gana heterogeniškas, jis turi kelis funkciškai skirtingus variantus, kurie pasižymi nevienodu gebėjimu palaikyti K1 ir K2 fenotipą (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017).

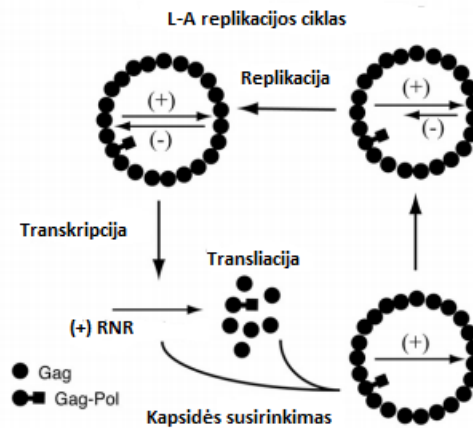


1 pav. *S. cerevisiae* ir *S. paradoxus* mielių dgRNR L-A virusų koduojamo Gag-Pol baltymo panašumai aminorūgščių ir nukleotidų sekų lygmenyse (pagal Vepškaitė-Monstavičė *et al.*, 2018).

1.3.1 L-A replikacijos ciklas

L-A viruso viriono viduje, skirtingu viruso replikacijos ciklo metu susintetinamos abi – koduojanti ir nekoduojanti RNR grandinės. Subrendusiose virusinėse dalelėse, turinčiose transkriptazės aktyvumu pasižyminčių fermentų, vyksta genomo transkripcija. Susintetinta nauja koduojanti (+) RNR grandinė pernešama iš virusinės dalelės į šeimininko ląstelės citoplazmą, kur vėliau yra transliuojama arba apgaubiamą kapsule (Wickner, 1996). Susipakuojant kapsidei, vienas ar du Gag baltymai pakeičiami Gag-Pol sulietiniu baltymu, kuris reikalingas RNR grandinės pakavimui į kapsidę ir replikacijai (Fujimura ir Esteban, 2010). Gag-Pol sąveika su (+) vgRNR skatina L-A kapsidės susirinkimą (Rodriguez-Cousino, et al., 2013). Susirinkusioje kapsidėje vyksta (-) RNR grandinės sintezė (replikacija), norint suformuoti genomine dgRNR. Vienoje virusinėje dalelėje telpa tik viena genomines dgRNR kopija (Wickner, et al., 2013) (2 pav.). Kaip

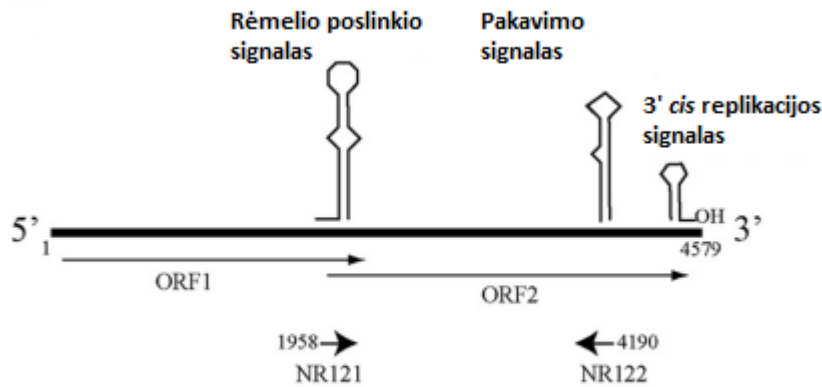
būdinga ir kitiems mieliagyrių ir grybų virusams, L-A virusas neturi užląstelinės formos, ir dukterinėms ląstelėms yra perduodamas vertikalios pernašos metu vykstant mitozei ar mejozei arba horizontalios pernašos būdu vykstant lytiniam mielių dauginimuisi (Rodriguez-Cousino, et al., 2013).



2 pav. L-A viruso replikacijos schema. Virusinėje dalelėje susintetinama (+) vgRNR, kuri pernešama į ląstelės citoplazmą ir supakuojama į naujai susintetintą tuščią virusinę dalelę. Dalelės viduje vyksta (+) vgRNR replikacija, susintetinama (-) RNR grandinė ir gaunama genomine dgRNR (pagal Rodriguez-Cousino, et al., 2013).

1.3.2 L-A virusų genomas

L-A viruso genomą sudaro du atviri skaitymo rėmeliai ORF1 ir ORF2, kurie persidengia per 130 nukleotidų. 5' ORF koduoja kapsidės baltymą Gag, o 3' ORF randama aminorūgščių seka, būdinga (+) vgRNR ir dgRNR virusų nuo RNR priklausomoms RNR polimerazėms (RDRP – angl. RNA-dependent RNA polymerase) (3 pav.). Polimerazė Pol ekspresuojama tik kaip 170-kDa Gag-Pol sulietinis baltymas, sintetinamas vykstant -1 ribosomos rėmelio poslinkiui. Šis poslinkis įvyksta maždaug 2% ribosomų, transliuojančių *gag* ir *pol* persidengimo regioną (Wickner, 1996). Du viruso genomo regionai pasižymi 100% sekų panašumu tarp skirtingų L-A virusų variantų. Vienas tokių regionų – rėmelio poslinkio regionas (1958 – 2004 nt.) bei pakavimo į kapsidės signalas (4169 – 4203 nt.). Toks sekų konservatyvumas rodo šių sekų svarbą L-A virusuose. (+) vgRNR grandinės 3' gale randamas *cis* replikacijos signalas, kurio 11 nukleotidų seka yra identiška L-A virusuose, išskyrus L-A-28, kur ši seka skiriasi dviem nukleotidais. Gag ir Pol koduojančių ORF konservatyvumas tarp skirtingų L-A virusų siekia 87 – 92%, o RDRP aminorūgščių konservatyvumas siekia 95% (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017).

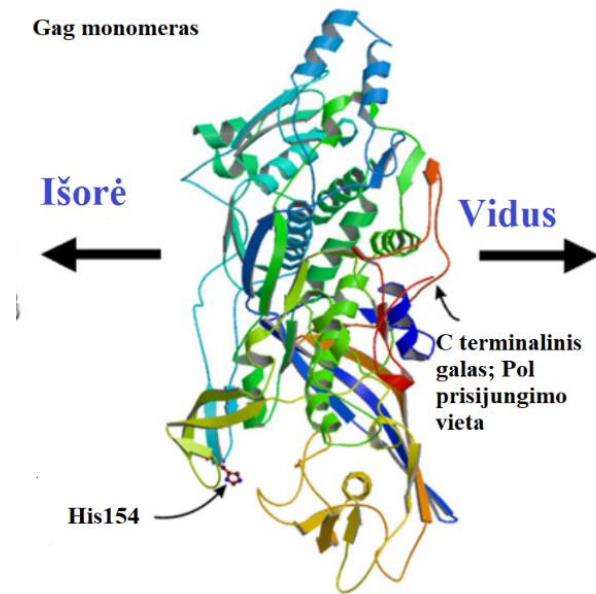


L-A (+) RNR grandinė

3 pav. L-A viruso genomo organizacijos schema. Schemoje pavaizduota L-A viruso (+) vgRNR grandinė ir du persidengiantys ORF (ORF1 ir ORF2). Grandinėje nurodytos antrinės struktūros: rėmelio poslinkio signalas bei 3' *cis* signalai, reikalingi replikacijai ir pakavimui į kapsidės (Rodriguez-Cousino ir Esteban, 2017).

Centrinis vgRNR surišantis domenas (Pol 374 – 432 a.) buvo aptiktas pašalinus dalį Pol C-galo sekos (506 – 546 a.). Viruso dauginimo proceso metu polimerazė turi prisijungti ir tada atpalaiduojama nuo virusinės RNR. Šis sąlyginis prisijungimas siejamas su Pol C-galo aminorūgščių seka, kuri taip pat siejama su polimeraziniu jos aktyvumu. N-terminalinio galo prisijungimo domenas (Pol 172 – 190 a.) yra regione, kuris svarbus virusinės RNR pakavime (Pol 67 – 213 a.), todėl manoma, kad šis domenas jungiasi prie pakavimo signalo RNR grandinėje (Wickner, 1996).

Gag baltymas atlieka ne tik struktūrinę funkciją, bet funkcionuoja ir kaip fermentas, kuris dalyvauja L-A sąveikoje su šeimininko ląstele. Gag baltymas pasižymi katalitiniu aktyvumu. Baltymo Gln139-Ser182 segmentas turi aktyvų centrą, kuriame yra His154 (4 pav.). Katalitinės reakcijos metu baltymas gali pašalinti 5' 7-metil-GMP kepurę nuo iRNR ir perkelti šią struktūrą ant savo His-154 molekulės. Šis aktyvumas svarbus virusinės iRNR raiškoje ir lemia virusinės RNR transliaciją šeimininko ląstelėje. Baltymo Gln139-Ser182 segmentas taip pat sudaro šiurkštų išorinį kapsidės paviršių (Luque *et al.*, 2018).

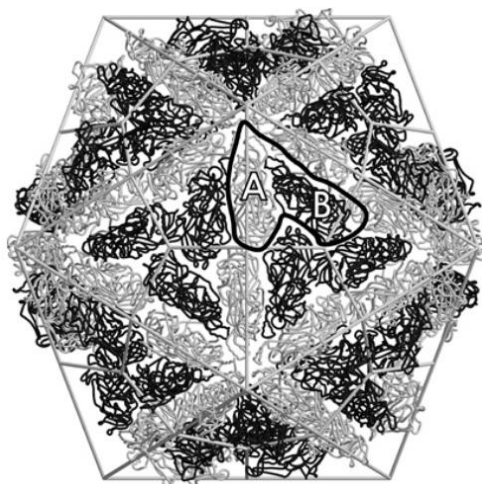


4 pav. Gag baltymo monomeras. Paveiksle nurodyta kuria kryptimi jis išdėstytas L-A viruso kapsidėje, taip pat nurodytas C-galas, prie kurio prisijungia viruso polimerazė, ir His154.

1.3.3 L-A viruso kapsidė

L-A viruso dgRNR koduojamas kapsidės baltymas Gag sudarytas iš 680 aminorūgščių ir yra 76 kDa dydžio, o sulietinio Gag-Pol baltymo dydis siekia 170 kDa. Gal baltymai susijungia kovalentiškai ir apgaubia virusinę dalelę, kurios diametras apie 40 nm, o kapsidės baltymų sluoksnio storis yra apie 56 Å. L-A viruso kapsidė sudaryta iš 120 Gag baltymo kopijų, kai vienas ar du Gag baltymai yra pakeisti Gag-Pol baltymu. Kapsidės struktūrinį vienetą sudaro asimetriškas Gag dimeras. Kiekvienas Gag baltymo monomeras gali būti dviejų konformacijų, vadinamų subvienetais A ir B, kurios skiriasi struktūriškai ir pasižymi skirtingomis savybėmis. A ir B subvienetai kapsidėje yra išsidėstę dviem rinkiniais po penkis. Penki A subvienetai yra išsidėstę aplink penkiabriaunį ikosaedro ašies centrą ir sudaro 18 Å diametro porą. Penki B subvienetai interkaluoti į A subvienetų struktūrą (Luque *et al.*, 2018) (5 pav.).

Viruso dgRNR supakuota sluoksniais viriono viduje. Infekcijos metu naujos virusinės (+) RNR grandinės patenka į šeimininko ląstelės citoplazmą per kapsidėje esančias poras (Wickner, 2013).

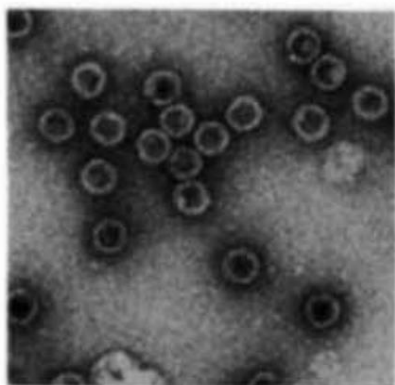


5 pav. L-A viriono struktūra. Nurodyti A ir B subvienetai ir jų išsidėstymas L-A viruso kapsidėje (pagal Wickner, 2013).

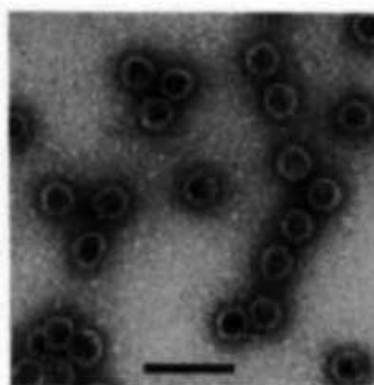
1.3.4 L-A viruso baltymų formuojamos VLP

L-A viruso struktūriniai Gag ir Gag-Pol baltymai formuoja pseudoviriono daleles VLP (angl. virus-like particles). Parodyta, kad L-A viruso kapsidės baltymo Gag pakanka VLP formavimui *in vivo*. Tuo tarpu VLP susiformavimui Pol nereikalinga. Todėl pašalinus *cis* pakavimo signalą - 24 nukleotidų seką, esančią 3' geno dalyje, nukleorūgštis į daleles nėra pakuojama (Fujimura *et al.*, 1992) (6 pav.).

A *gag*



B *gag + pol*



6 pav. Elektronų mikroskopijos metodu gautos nuotraukos, kuriose matosi mielių ląstelėse suformuotos VLP. A paveiksle VLP sudaro Gag baltymai, B paveiksle VLP sudaro Gag-Pol baltymai (pagal Fujimura *et al.*, 1992).

1.4 Pseudoviriono dalelės

Dauguma VLP sudarytos iš viruso nukleokapsidės baltymų, sudarytų iš kelių monomerų kopijų, turinčių kvazi ekvivalentines konformacijas ir sudarančių ikosaedrinės arba spiralinės formos konstrukcijas. Galutinė VLP struktūra priklauso nuo tam tikro

viruso, bet gali kisti priklausomai nuo nukleorūgščių buvimo ir biofizikinių sąlygų dalelės susikonstravimo metu (Mohsen *et al.*, 2018). Visos VLP pasižymi tam tikromis savybėmis:

- VLP sudarytos iš virusų struktūrinių baltymų, kurie geba susirinkti savaime į tam virusui būdingą erdvinę struktūrą esant tam tikromis sąlygomis.
- VLP yra ne infekcinės dalelės, kadangi neturi viruso genominės medžiagos ir negali replikuotis.
- Dalelių dydis siekia 20 – 200 nm.
- VLP pasižymi aukštu stabilumu, yra homogeniškos ir aiškiai apibrėžtos fizikinės struktūros.
- VLP lengvai pagaminamos ir gryninamos, naudojant įvairias raiškos sistemas išgaunami dideli jų kiekiai.
- Galimos įvairios VLP modifikacijos, kurios nedaro įtakos dalelių susirinkimui ir stabilumui (Şereflioğlu *et al.*, 2017).

VLP dalelių baltymai gali būti išsidėstę vienu, dviem ar trimis sluoksniais.

Žmogaus papildomos viruso HPV (angl. *human papillomavirus*) atveju, VLP formuojamos iš vienu sluoksniu išsidėsčiusių struktūrinių viruso baltymų. Kitos, labiau kompleksiškos VLP būna sudarytos iš kelių struktūrinių baltymų, pavyzdžiui, *Reoviridae* šeimos virusų formuojamos VLP sudarytos iš 2 - 4 skirtingų baltymų, išsidėsčiusių keliais sluoksniais. Dalelės taip pat gali turėti išorinį lipidinį sluoksnį – apvaskalą. Tokios VLP susidaro, kai viruso infekcijos metu viriono dalelės išeina iš ląstelės pumpuravimo (angl. budding) proceso metu. Tada viriono dalelė apgaubiamą ląstelės plazminės membranos dalimi. Tokiu pat mechanizmu susidaro ir HIV-1 VLP, kurias sudaro Gag baltymas ir dalis ląstelės šeimininkės plazminės membranos lipidų (Fuenmayor, et al., 2017). Kuriant chimerines VLP, į apvaskalą turinčių dalelių lipidinį sluoksnį galima inkorporuoti pilno ilgio monomerinius ar multimerinius baltymus. Tuo tarpu, apvaskalo neturinčių VLP baltymai gali būti modifikuojami pridedant trumpus peptidus (Ungaro *et al.*, 2013). Apvaskalo neturinčias VLP lengviau gaminti ir gryninti, tačiau apvaskalą turinčių VLP panaudojimas yra platesnis (Naskalska ir Pyrc, 2019). VLP apvaskalo baltymai taip pat gali veikti kaip specifinių audinių receptorių signalai. Tai leidžia nukreipti daleles į specifinį audinį.

1.4.1 VLP raiškos sistemos

Norint pasigaminti VLP ir pasiekti tinkamą VLP struktūrinių baltymų susilankstymą bei tinkamas potransliacines modifikacijas, pirmiausia reikia atsižvelgti į raiškos sistemą. Šiuo metu yra galimos kelios raiškos sistemos, kurios turi savo privalumų bei trūkumų (1 lentelė).

1 lentelė. VLP raiškos sistemos platformos, jų privalumai ir trūkumai (Fuenmayor, Gòdia ir Cervera, 2017).

| Raiškos sistema | Privalumai | Trūkumai |
|--------------------|--|---|
| <i>E. coli</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Paprasta raiškos sistema • Galima išgauti didelius kiekius • Pigi sistema | <ul style="list-style-type: none"> • Negalimas baltymų glikozilinimas • Endotoksinai |
| Mielės | <ul style="list-style-type: none"> • Paprasta raiškos sistema • Galima išgauti didelius kiekius • Pigi sistema | <ul style="list-style-type: none"> • Netinkamas baltymų glikozilinimas • Galimas neteisingas baltymų susilankstymas |
| Vabzdžių ląstelės | <ul style="list-style-type: none"> • Galima gauti daug teisingai susidariusių VLP didelio tankio ląstelių kultūrose • Rizika kartu kultivuoti oportunistinius patogenus mažesnė, nei naudojant žinduolių ląsteles • Ląstelių gaminami komponentai gali būti pritaikomi kaip adjuvantai kuriant vakcinas | <ul style="list-style-type: none"> • Limituota kai kurių glikoproteinų modifikacija • Sunku atsikratyti virusų (<i>Baculovirus</i>) komponentų • Vabzdžių ląstelių ar viruso komponentai gali užmaskuoti imuninę atsaką prieš norimą epitopą |
| Žinduolių ląstelės | <ul style="list-style-type: none"> • Ląstelės labiausiai atitinka natūralų šeimininką • Tinkamos potransliacinės modifikacijos ir VLP susidarymas | <ul style="list-style-type: none"> • Didesnės gamybos VLP išlaidos • Mažesnės VLP išeigos, ilgesnis gamybos laikotarpis |
| Augalai | <ul style="list-style-type: none"> • Paprasta raiškos sistema • Galima išgauti didelius | <ul style="list-style-type: none"> • Netinkamos potransliacinės modifikacijos ir VLP |

| | |
|---|--|
| kiekius | susidarymas |
| <ul style="list-style-type: none"> • Nėra užteršimo žmogaus virusais | <ul style="list-style-type: none"> • Žema raiška • Žemas stabilumas, galimas antigenų degradavimas |

Gyvūnų ląstelės yra tinkamiausia VLP raiškos sistema, kadangi vykdomos visos kompleksiškos potransliacinės baltymų modifikacijos, reikalingos tinkamam baltymų susilankstymui. Nors žinduolių ląstelėse suformuojamos ir apvaskalę turinčios, ir apvaskalo neturinčios bei chimerinės VLP, tačiau ši raiškos sistema yra brangi, potencialiai nesaugi, o VLP dalelių išeiga yra maža (Naskalska ir Pyrc, 2019). Bakterijų ir mielių raiškos sistemos yra lengvai pritaikomos ir ekonomiškos. Pagrindinis šių raiškos sistemų privalumas – aukšta VLP išeiga, tačiau bakterijose nevyksta potransliacinės baltymų modifikacijos, kurios gali būti labai svarbios VLP susikonstravimui. Kita vertus, mielės yra eukariotinių ląstelių raiškos sistema, kurioje vyksta potransliacinės baltymų modifikacijos (Fuenmayor, Gòdia ir Cervera, 2017). Kadangi mielių potransliacinės modifikacijos nesutampa su žinduolių baltymų modifikacijomis, mielių raiškos sistema daugiausiai naudojama apvaskalo neturinčių VLP gamybai (Naskalska ir Pyrc, 2019). VLP gamyba naudojant augalų raiškos sistemą turi dvi fazes: infekcijos ir produkcijos. Ši sistema, panaudojant bakulovirusus, yra greita ir paprasta bei leidžia kurti vakcinas prieš greitai mutuojančius virusus, kurių paviršiaus baltymų struktūra kinta tarp kiekvieno virusų protrūkio. Pagrindinis šios sistemos trūkumas – tai, kad bakulovirusų apvaskalo baltymai gaminami tuo pat metu kaip VLP, kas apsunkina jų gryninimą. Transgeniniai augalai taip pat naudojami VLP gamybai. Šių ląstelių infekcijai ir transformacijai dažniausiai naudojamos *Agrobacterium tumefaciens* bakterijos, kurios infekuoja augalo ląsteles ir įterpia specifinį geną į jų genomą. Dažniausiai naudojamos *Nicotiana tabacum* ir *Arabidopsis thaliana* augalų raiškos sistemos (Fuenmayor, et al., 2017).

1.5 VLP panaudojimas

VLP dalelės gali būti pritaikomos vaistų pristatymui, genų terapijoje ir vėžio gydyme (Fuenmayor, et al., 2017). VLP yra laikomos saugiomis, kuriant profilaktines ir terapines vakcinas. Dalelės, kurių diametras siekia 20 - 150 nm, pasižymi nanomedžiagoms būdingomis savybėmis, tokiomis kaip didelis paviršiaus plotas, lengvai prieinamomis paviršiaus aminorūgštimis, taisyklinga erdvine struktūra ir biologiniu

suderinamumu, todėl gali būti pritaikomos nanomedžiagų ir pernašos sistemų kūrimo (Yan et al., 2015).

1.5.1 VLP pagrindu sukurtos vakcinos

Išaktyvuotų ir susilpnintų vakcinų atveju yra tikimybė, jog virusas įgaus patogenišką pavidalą vakcinuotuose individuose. Naudojant tokias vakcinas, po vienos vakcinacijos sunku pasiekti norimą imunizacijos lygį. Todėl siekiama rasti kitokių vakcinų kūrimo metodų, kurie būtų efektyvesni, ekonomiškesni ir kuriais pagamintos vakcinos būtų saugesnės. VLP jau bandoma pritaikyti kaip imunogeniškas molekules rekombinantinių vakcinų gamyboje, taip pat dalelės jau yra naudojamos kaip terapinės vakcinos, skirtos paskatinti specifinių antikūnų prieš endogenines molekules gamybą (Yan et al., 2015). Kelios VLP vakcinos jau yra licencijuotos ir komerciškai prieinamos bei daug VLP pagrindu gaminamų vakcinų yra klinikinių bandymų stadijoje (Kushnir, Streatfield ir Yusibov, 2012).

VLP tinka vakcinų gamybai, nes neturi viruso genetinės medžiagos ir yra saugios. Struktūrinių baltymų išsidėstymas VLP yra identiškas natyviame virusui, todėl norimas imuninis atsakas gali būti sukeliamas papildomai nenaudojant jokių adjuvantų. Taip pat VLP vakcinos gali būti naudojamos kovojant prieš greitai kintančius virusus, kadangi jų gamybos procesas nėra sudėtingas ir trunka sąlyginai neilgai. VLP gali būti atpažįstamos PRR receptorių (angl. pattern recognition receptor), esančių ant antigenų pateikiančių ląstelių, ir sukelti įgytą ląstelinį ir humoralinį imuninį atsaką.

Terapinės VLP pagrindu sukurtos vakcinos veikia kaip tam tikrų epitopų vektorius. Pateikiami ne tik svetimi, bet ir savi viruso antigenai. Taip terapines VLP vakcinas siekiama pritaikyti gydant įvairias chroniškas ligas ar vėžį (Yan et al., 2015). Chimerinės VLP taip pat naudojamos kuriant vakcinas neinfekcinių ligų gydymui. Šių vakcinų paskirtis sukelti specifinį imuninį atsaką prieš tam tikrus antigenus. Kuriamos chimerinės VLP, turinčios antigenus, tipiškus vėžinėms ląstelėms (melanomos), neurodegeneracinėms (Alzheimerio liga) ir autoimuninėms (rinokonjunktyvitas, astma) ligoms (Naskalska ir Pyrc, 2019).

1.5.2 VLP pernašos sistemos

Kaip nano dydžio medžiaga, VLP turi potencialą būti panaudojamos vaistų ar kitų įvairių junginių pernašoje. VLP gali būti plačiai pritaikomos kuriant pernašos sistemas, kadangi jas pakankamai lengva pasigaminti dideliais kiekiais, naudojant gerai žinomas

raiškos sistemas (Yan *et al.*, 2015). Dauguma VLP gali patekti į įvairias ląsteles endocitozės būdu, priklausomai nuo jose esančių ligandų. Šie ligandai susiriša su paviršiniaisiais ląstelių receptoriais, kas lemia dalelių patekimą į ląsteles, o tai kartu palengvina ir terapinių junginių patekimą. Norint tikslingai nukreipti daleles į specifines ląsteles, galimos įvairios VLP modifikacijos, tokios kaip dalelių baltymų genų modifikacijos ar cheminių junginių prijungimas prie VLP struktūrų. Be to, VLP yra pakankamai talpios ir gerai toleruoja svetimą medžiagą įterpimą. Fizinį įvairių organinių ar neorganinių medžiagų padengimą VLP baltymais galima lengvai pasiekti naudojant osmosinį šoką, cheluojančius junginius ar keičiant pH reikšmes (Naskalska ir Pyrc, 2019). Svarbu, jog dėl savo ikosaedrinės struktūros VLP pasižymi termodinaminiu stabilumu. Būtent šios savybės leidžia panaudoti tokias daleles vaistų ir kitų medžiagų pernašai, genų terapijoje ar kitose srityse.

Chemoterapinio vėžio gydymo pagrindinis šalutinis efektas yra vaisto toksiškumas sveikiems audiniams, kas labai limituoja šio gydymo terapinį pritaikymą. Priešvėžinius vaistus, tokius kaip adriamiciną ir aleomiciną galima prijungti prie VLP paviršiaus per hidrazono jungtis su dalelių paviršinėmis aminorūgščių liekanomis. Priešvėžiniai junginiai gali būti patalpinami į VLP vidų, remiantis VLP gebėjimu susirinkti į apibrėžtas struktūras prie tam tikrų sąlygų. Panaudojant tam tikras VLP modifikacijas, pernešami junginiai gali pasiekti tikslinius audinius ir sukelti mažesnę toksiškumą sveikiems audiniams (Yan *et al.*, 2015). Yra tyrimų, kuriuose atliktas sėkmingas priešvėžinių junginių, tokių kaip bleomicinas ir doksorubicinas, pernešimas panaudojant chimerines VLP (Naskalska ir Pyrc, 2019). Parodyta, jog doksorubicinas, kuris buvo chemiškai prijungtas prie chimerinių VLP dalelių, sudarytų iš roto viruso VP6 baltymo su prijungta laktobionine rūgštimi, yra lengviau pasisavinamas hepatomos ląstelių, turinčių asialglikoproteinų receptorių (Zhao *et al.*, 2011).

2 MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Terpės

Minimali mielių auginimo SD terpė, sudaryta iš: 2 % gliukozės (*Merck*), 0,67 % mielių azoto šaltinio Yeast nitrogen base (*ROTH*) ir papildyta amino rūgštimis (L-leucinu, L-metioninu, histidinu) (*Sigma-Aldrich*).

YPD terpė, kurią sudaro: 2 % peptono (*Liofilchem*), 1 % mielių ekstrakto (*Liofilchem*), 2 % gliukozės (*Merck*).

RPMI terpė (*Biochromas AG*), papildyta 1 % gentamicino (*ROTH*) ir glutamino (*Sigma-Aldrich*) mišiniu bei 10 % fetaliniu veršelio serumu FBS (*Biochromas AG*).

2.1.2 Tirpalai ir buferiai

20X Ardymo buferis, sudarytas iš: 400 mM Tris-HCl (pH 7,4) (*AppliChem*), 200 mM NaCl (*Reachim*) ir 1M KCl (Roth). Elektroforezės buferis 10X Tris-Gly-SDS (*Sigma-Aldrich*). Blukinimo buferis, kurį sudaro: 30 % izopropanolio (*Reachim*), 10 % acto rūgšties (*Sigma-Aldrich*); 70 % etanolio tirpalas (*Vilniaus degtinė*). Gel filtracijos buferis, sudarytas iš: 10 mM Tris – HCl, pH = 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glicerolio, 0.1 % Tryton X100. Fosfatinis buferis PBS pH = 7.4 (10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) (*Sigma-Aldrich*).

2.1.3 Reagentai

Thermo Fisher Scientific: proteazių inhibitorius PMSF, 2mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konc. BSA baltymo tirpalas, 30 % akrilamido - bisakrilamido AA:BIS tirpalas, amonio persulfatas APS, tetrametiletilendiaminas TEMED. *AppliChem*: trisaminometanas Tris. *Reachim*: sacharozė, natrio dodecilsulfatas SDS. *Sigma-Aldrich*: Stiklo rutuliukai (212-300 μm), tripsinas (Tryp) ir etilendiamintetraacto rūgštis EDTA. *Pharmacia Fine Chemicals*: gel-filtracijos sorbentai: Sephadex G-10, G-25, G-50, G-100, G-200. Roth: poliakrilamidas PEG4000, HCl.

Priešvėžiniai agentai:

0,4M 5-fluoruracilas (5-FU). Šis junginys naudojamas vėžio gydyme. 5-FU veikimas pagrįstas timidilato sintazės (TS) inhibicija ir jo metabolitų inkorporavimu į DNR struktūrą. Sustabdžius TS veikimą, blokuojama timidino sintezė. Trūkstant šio

nukleozido, DNR sintezė sustoja, todėl greitai besidalinančios vėžinės ląstelės žūva (Carrillo *et al.*, 2015).

2mg/mL konc. doksorubicinas (Dox). Tai chemoterapinis vaistas, naudojamas gydyti įvairiems vėžio atvejams. Dox priklauso antraciklinų ir priešvėžinių antibiotikų šeimai. Žinoma, kad doksorubicinas sąveikauja su DNR replikacijos ir transkripcijos metu dalyvaujančiais fermentais, interkaluoja į DNR struktūrą bei sąveikauja su kitomis ląstelės molekulėmis ir junginiais, taip sukeldamas citotoksinį efektą. Dox sąveikauja su I ir II topoizomerazėmis, dėl ko atsiranda DNR pažeidimai ir ląstelės ciklas yra slopinamas G1 ir G2 fazėse. Taip pat žinoma, kad doksorubicinas įsiskverbdamas į DNR, slopindamas DNR ir RNR polimerazę, galiausiai taip yra nutraukiama DNR replikacija ir transkripcija (Tacar, Sriamornsak ir Dass, 2013). Doksorubicino molekulę sudaro šešių narių duanosaminas – tetrahidroksi-antrachinonas su glikozilo fragmentu. Šis junginys pasižymi antibiotikams antraciklinams būdinga struktūra. Dox pasižymi vidine fluorescencija, kuri yra vertinga priemonė įvairiems tyrimams ir vaizdavimui. Dox fluorescuoja 595 nm bangos ilgio šviesa, kai yra sužadinas 470 nm bangos ilgio lazeriu (Shah *et al.*, 2017).

2.1.4 Dažai

Thermo Fisher Scientific: 5X baltymų dažas Protein Loading Dye, elektroforezės gelio dažas Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye, baltyminiai dydžio standartai: PageRuler Protein Ladder ir PageRuler Prestained Protein Ladder Plus. *Reachim*: Crystal violet (N-4[bis[4-dimetilamino-fenil]metilen-2,5-cikloheksadien-1-ilidin-N-metilmetamino chloridas) dažas.

2.2 Mielių *S. cerevisiae* kamienai

2 lentelė Darbe naudoti *Saccharomyces cerevisiae* mielių kamienai (Konovalovas, 2018)

| Pavadinimas | Genotipas |
|--------------------|---|
| BY4741 Δski3 | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>ski3Δ0</i> |
| BY4741 ΔPOR1 | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>por1Δ0</i> |
| BY4741 ΔPOR1 GagWT | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>por1Δ0</i> ; <i>Sc-V-LA-1-gag</i> |
| BY4741 GagWT | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>ScV-LA-1-gag</i> |
| BY4741 GagΔ | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>ScV-LA-1-gagΔ</i> |
| BYΔLA GagWT | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; LA-0; <i>ScV-LA-1-gag</i> |

| | |
|--------------------|---|
| BYΔLA | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; LA-0 |
| BY4743 | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2D0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> |
| BY4743 Gag-mCherry | MATα; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2D0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; ScV-LA-1-gag-mCherry |

Darbe naudoti mielių kamienai įsigyti iš Open Biosystems ir pagal poreikį transformuoti plazmidinėmis raiškos konstrukcijomis.

BY4741 Δski3 laboratorinis *S. cerevisiae* mielių kamienas pasižymi tuo, kad yra pašalintas SKI sistemos, kurią sudaro 8 genai, *ski3* (angl. Superkiller protein 3) genas. SKI sistemą sudaryta iš Ski1 (5'→3' egzozonukleazė Xrn1) ir Ski komplekso, kurį sudaro Ski2, Ski3, Ski8 baltymai. Ski kompleksas pasižymi 3'→5' egzozonukleaziniu aktyvumu. SKI sistemą taip pat sudaro ir egzosoma, kuri sudaryta iš Ski4/Csl4, Ski6 ir kitų baltymų. *Ski3* geno pašalinimas iš LA virusą turinčio kamieno lemia LA viruso genomo skaičiaus padidėjimą ląstelėje.

BY4741 ΔPOR1 kamiene yra pašalintas *POR1* genas, kuris koduoja mitochondrijos poriną. Dėl *POR1* geno delecijos mielių kamiene stimuliuojama L-A viruso replikacija. BY4741 ΔPOR1 GagWT kamienas papildomai transformuotas pYAK3-ScV-L-A-1-gag plazmide, kas lemia didesnę Gag baltymo sintezę mielių ląstelėse.

BY4741 GagWT laboratorinis mielių kamienas transformuotas pYAK3-ScV-L-A-1-gag plazmide, turinčia natyvų LA-1 viruso *gag* geną.

BY4741 GagΔ kamienas transformuotas pYAK3-ScV-L-A-1-gagΔ plazmide, kuri koduoja LA-1 viruso delecinį Gag baltymą. GagΔ baltymo C-gale pašalintos 34 amino rūgštys. GagΔ baltymo sintezė kamiene slopina L-A viruso genomo replikaciją ir kapsidėse nėra pakuojama viruso nukleorūgštis.

BYΔLA kamiene pašalintas natyvus LA-1 virusas. BYΔLA GagWT kamienas transformuotas pYAK3-ScV-L-A-1-gag plazmide.

BY4743 GagWT-mCherry kamienas turi įterptą pYAK3-ScV-L-A-1-gag-mCherry plazmidę, kuri koduoja pilno ilgio L-A viruso Gag baltymą su C-gale prilietu mCherry (Konovalovas, 2018). mCherry – tai ryškiai raudonai fluorescuojantis monomerinis 26.7 kDa baltymas. mCherry geriausiai sužadinamas 587 nm bangos ilgio šviesa ir fluorescuoja 610 nm bangos ilgio šviesa (<https://www.fpbases.org/>).

2.3 Eukariotinės ląstelės

Naudotos žmogaus storosios žarnos karcinomos epitelinių ląstelių linija HCT116. Ląstelės yra adhezinės ir pasižymi epiteline morfologija, kultivuojant *in vitro* ląstelės formuoja kolonijas. Ši ląstelių linija plačiai naudojama įvairiuose terapiniuose tyrimuose bei naujų vaistų ar priešvėžinių junginių testavimui (<http://www.lgcstandards-atcc.org>).

2.4 Įranga

Termostatas, purtymo stovas, purtyklė *Vortex*, autoklavas, šaldoma centrifuga *Eppendorf*, ultracentrifuga (*SANYO MSE MS60*, rotorius TST 28.38/7), *Bechamn* centrifuga (rotorius A-J14), svarstyklės, kaitinimo stovas, elektroforezės gelio sistema (*Bio-Rad*), šviesinis mikroskopas (*Olympus*), kamera Biürke, CO₂ termostatas, laminarinio oro srauto spinta, gelių fotografavimo aparatas (*Bio-Rad*), mikrobangų krosnelė, spektrofotometras, fluorescencinis mikroskopas (*Olympus AX70*).

2.5 Programinė įranga

Microsoft Excel 2016, ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), fluorescencinio mikroskopo fotografavimo programa *Image-ProPlus 6.1*, *Bio-rad* gelių fotografavimo programa *Image Lab 3.0 Software*.

2.6 Metodai

2.6.1 *Saccharomyces cerevisiae* kultivavimas ir biomasės surinkimas

Transformuoti mielių kamienai apie 24 valandas auginami minimalioje augimo terpėje, tada perkeliama į YPD terpę ir auginami dar apie 24 valandas. Netransformuoti mielių kamienai auginami dvi paras YPD terpėje. Mielės kultivuojamos 30 °C nuolat purtant. Surinkta mielių biomasė centrifuguojama 4 °C temperatūroje 7 min., 1000 x g sąlygomis. Terpė nupilama, o gauta mielių biomasė pasverinama. Toliau mielių biomasė laikoma šaltai 4 °C temperatūroje. Jei mielių biomasė tolimesniems darbams naudojama ne iš karto, ji saugoma -20 °C temperatūroje.

2.6.2 Mielių biomasės ardymas stiklo rutuliukais

Mielių biomasė resuspenduojama 1X ardymo buferyje su 1 % PMSF. Biomasė ardoma purtant su 212-300 μm skersmens stiklo rutuliukais. Suardyta biomasė su stiklo rutuliukais centrifuguojama 4 °C temperatūroje 10 min., 1000 x g. Po centrifugavimo skystis be stiklo rutuliukų surenkamas ir centrifuguojamas 4 °C temperatūroje 10 min, 10000 x g sąlygomis kelis kartus, kol tirpalas tampa skaidrus.

2.6.3 L-A-1 viruso komponentų gryninimas

Gryninimas naudojant sacharozės pagalvę

Pagaminamas sacharozės pagalvės tirpalas, sudarytas iš 45 % sacharozės ir 5 % 20X ardymo buferio. Sacharozės pagalvės tirpalas paskirstomas po 20 mL į specialius ultracentrifugavimo mėgintuvėlius. Ant sacharozės tirpalo užpilamas vienodas kiekis suardytos mielių biomasės mėginio. Mėgintuvėliai ultracentrifuguojami 4 °C temperatūroje 4 valandas 20000 x g pagreičiu lėtai įsibėgėjant ir lėtai stabdant. Po ultracentrifugavimo atsargiai nusiurbiamas sacharozės tirpalas, gautos nuosėdos ištirpinamos 1X ardymo buferyje. Mėginiai saugomi 4 °C temperatūroje iki tolimesnio jų panaudojimo.

Gryninimas naudojant sacharozės gradientą

Pagaminami trijų skirtingų sacharozės koncentracijų tirpalai: 80 %, 60 %, 50 %, kur atitinkamas kiekis sacharozės ištirpinamas 1X ardymo buferyje. Į centrifugavimo mėgintuvėlius susluoksniuojamas sacharozės gradientas – įpilama: 5 mL 80 % sacharozės tirpalo, 5 mL 60 % sacharozės tirpalo ir iki 15 mL 50 % sacharozės tirpalo. Ant gradiento viršaus užpilamas vienodas kiekis mielių lizato (1 – 3 mL). Mėgintuvėliai ultracentrifuguojami 4 °C temperatūroje 4 valandas 23500 x g pagreičiu lėtai įsibėgėjant ir lėtai stabdant. Po ultracentrifugavimo surenkamos visos frakcijos. 60 % ir/ar 50 % frakcijose esantys baltymai išsodinami 20 mL 1X ardymo buferyje toliau ultracentrifuguojant 4 °C temperatūroje 40 minučių 23500 x g greičiu. Po ultracentrifugavimo supernatantas nupilamas, nuosėdos ištirpinamos 1X ardymo buferyje ir tirpalas saugomas 4 °C temperatūroje.

Tolimesnis baltyminių mėginių gryninimas naudojant gel-filtracijos kolonėles

Po sacharozės gradiento gauti baltyminiai mėginiai toliau gryninami, naudojant gel-filtracijos metodą. Skirtingi sorbentai brinkinami 24 - 72 valandas 4 °C temperatūroje tam tikrame tūryje vandens (Amersham Pharmacia Biotech AB, 1998) (3 lentelė). Paruošiamos gel-filtracijos kolonėlės: 1,5 mL mėgintuvėliai su filtrais užpildomi apie 250 µL išbrinkintu sorbentu. Kolonėlės nulygvarinamos gel-filtracijos buferiu. Ant kolonėlių užnešamas vienodas kiekis baltyminio mėginio. Kolonėlė centrifuguojama mikrocentrifuga apie 5 min., gautas skystis surenkamas. Kolonėlė praplaunama gel-filtracijos buferiu, nucentrifuguojama ir gautas skystis taip pat surenkamas.

3 lentelė. Darbe naudoti sorbentai, jų brinkimui reikalingas vandens kiekis ir baltymų frakcionavimo ribos (Amersham Pharmacia Biotech AB, 1998).

| Sorbentas | Vandens tūris, reikalingas 1g sorbento išbrinkimui, ml | Baltymų frakcionavimo ribos |
|-----------------------------|--|-----------------------------|
| Sephadex G-10 (40 – 120 μm) | 2 – 3 | <700 |
| Sephadex G-25 (50 – 150 μm) | 4 – 6 | 1 000 – 5 000 |
| Sephadex G-50 (10 – 40 μm) | 9 – 11 | 1 500 – 30 000 |
| Sephadex G-100 (10 – 40 μm) | 15 – 20 | 4 000 – 100 000 |
| Sephadex G-200 (10 – 40 μm) | 20 – 25 | 5 000 – 250 000 |

Baltymų gryninimas naudojant PEG4000

Pagaminamas 25 % PEG4000, 1.5 M NaCl pradinis tirpalas 1x ardymo buferyje. Šio tirpalo įpilama į mėgintuvėlį su mielių lizatu (galutinė tirpalo koncentracija mėgintuvėlyje 5 % PEG4000, 0.5 M NaCl). Inkubuojama 30 min., 4 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai nucentrifuguojami 10 min., 4 °C temperatūroje 15 500 x g pagreičiu. Supernatantas surenkamas tolimesnei analizei, o nuosėdos praplaunamos 5 % PEG4000, 0.5 M NaCl, 1x ardymo buferis, tirpalu. Praplovimo buferis surenkamas, nuosėdos ištirpinamos 1x ardymo buferyje ir saugomos 4 °C temperatūroje.

2.5.4 Baltyminių mėginių paruošimas ir elektroforezė

PAG gamyba:

8 % frakcionuojančiui geliui paruošti naudojama 4,73 mL sterilaus dejonizuoto vandens, 2,7 mL 30 % AA:BIS, 2.5 mL Tris-SDS, pH 8,8 buferio, 60 μL 10 % APS, 13 μL TEMED. 5 % koncentruojančio gelio gamybai naudojama 3 mL sterilaus dejonizuoto vandens, 700 μL 30 % AA:BIS, 1,25 mL Tris-SDS, pH 6,8 buferio, 25 μL 10 % APS, 20 μL TEMED.

Kalibracinės kreivės mėginių paruošimas

Kalibracinei kreivei paruošti naudojamas žinomos koncentracijos (1 μg/μL) BSA baltymas. Paruošiami skirtingo kiekio BSA baltyminiai mėginiai (7; 5; 2,5; 1,5, 1; 0,5; μg BSA pradiniam mėginyje), kuriuos sudaro 5X baltyminio dažas Protein Loading Dye, 0,2

mM DTT, 20X ardymo buferis. Paruošti mėginiai inkubuojami 5 min. 95 °C temperatūroje.

Tiriamųjų mėginių paruošimas

SDS-PAGE analizei baltyminiai mėginiai ruošiami naudojant 5X baltyminių dažų Protein Loading Dye, 0,2 mM DTT. Visi paruošti mėginiai pakaitinami 95 °C temperatūroje 5 minutes.

Elektroforetinė baltymų analizė

Elektroforetinei baltymų analizei į gelio šulinėlius užnešama 10 µL mėginių: baltyminis dydžio standartas, kalibracinės kreivės mėginiai bei tiriamieji mėginiai. Naudojamas 10 % PAG. Vieno gelio elektroforezė vykdoma 1X Tris-Gly-SDS buferiniame tirpale apie 5 min, nustatčius 15mA srovę. Mėginiams pasiekus koncentruojantį gelį, srovė padidinama iki 25 mA ir elektroforezė tęsiama tol, kol dažas išeina iš gelio.

Gelio dažymas

Gautas gelis užpilamas gelio dažu Coomassie Brilliant Blue R-250 ir pakaitinamas apie 5 minutes. Toliau gelis dažomas bent 20 minučių švelniai purtant. Po dažymo gelis praplaunamas dejonizuotu vandeniu ir blukinamas blukinimo tirpalu iki 20 minučių. Po blukinimo gelis praplaunamas dejonizuotu vandeniu ir laikomas vandenyje 4 °C temperatūroje iki jo fotografavimo.

2.6.5 Baltymo kiekio ir koncentracijos nustatymas

Baltyminis gelis fotografuojamas ir toliau analizuojamas ImageJ programa. Vykdoma densitometrinė mėginių analizė. Pagal gelio juostų intensyvumą ir kalibracinės kreivės mėginių kiekį viename šulinėlyje sudaroma kalibracinė kreivė. Tiriamojo baltymo kiekis ir koncentracija gautuose baltyminiuose mėginiuose nustatomi pagal kalibracinės kreivės lygtį.

2.6.6 HCT116 ląstelių kultivavimas ir gyvybingumo vertinimas

HCT116 ląstelės kultivuojamos įprastoje augimo terpėje (RPMI terpė, papildyta 1 % L-glutamino ir gentamicino mišiniu ir 10 % FBS). Ląstelės užsėjamos 4×10^4 per šulinėlį tankiu į 24 šulinėlių plokšteles ir kultivuojamos 48 valandas 5 % CO₂ inkubatoriuje 37 °C temperatūroje.

L-A-1 viruso komponentų citotoksiškumo vertinimui HCT116 ląstelėms po 48 valandų jų kultivacijos pridedamas atitinkamas kiekis baltyminio mėginio, išskirto iš skirtingų *S. cerevisiae* kamienų. Paskaičiuota, kad viename šulinėlyje būtų 6 µg arba 4 µg Gag baltymo. Ląstelių gyvybingumo vertinimui, kaip teigiama kontrolė, pateikiamas ir 1 mM 5-FU arba 0,1 mM 5-FU tirpalas. Taip pat ląstelės kultivuojamos ir su 1X ardymo buferiu, norint nustatyti, ar jis nedaro įtakos ląstelių gyvybingumui. Ląstelės kultivuojamos dar 48 valandas.

L-A-1 kapsidžių transfekcinio pajėgumo vertinimui po 48 valandų kultivacijos į mitybinę terpę pridedama skirtingos koncentracijos doksorubicino tirpalo (20, 50, 100, 200 ng/mL). Į dalį šulinėlių pridedama baltyminio mėginio, išskirto iš BY4741 ΔPOR1 GagWT kamieno. Gag baltymo kiekis šiuose šulinėliuose siekia apie 13 µg (0,03 µg/µL). Į neigiamos kontrolės šulinėlius pridedama 1X ardymo buferinis tirpalas. Taip pat ląstelės kultivuojamos vien su baltyminiu mėginiu, norint įsitikinti, jog šis nedaro neigiamos įtakos ląstelių gyvybingumui. Ląstelės toliau auginamos dar 48 valandas.

2.6.7 Doksorubicino citotoksiškumo vertinimas

Doksorubicino citotoksiškumo vertinimui pasirinktos 5 skirtingos junginio koncentracijos: 10 ng/mL (18,5 nM), 20 ng/mL (37 nM), 50 ng/mL (92,5 nM), 100 ng/mL (185 nM), 150 ng/mL (277,5 nM), 200 ng/mL (370 nM), 300 ng/mL (555 nM). Pirmiausia ląstelės užsėjamos 8×10^4 ląstelių per šulinėlį tankiu į 12 šulinėlių plokštelę ir kultivuojamos 48 valandas augimo terpėje. Po 48 valandų ląstelėms pakeičiama terpė ir pridedamas skirtingas kiekis Dox. Ląstelės kultivuojamos dar 48 valandas, po kurių matuojamas jų gyvybingumas dažant Crystal Violet dažu.

2.6.8 HCT116 gyvybingumo vertinimas

Po HCT116 ląstelių gyvybingumas vertinamas dažant Crystal Violet dažu. Pirmiausia nuo ląstelių nusiurbiamą terpę, jos praplaunamos PBS tirpalu, tada ląstelės 10 min fiksuojamos 70 % etanolio tirpalu, tirpalas nusiurbiamas ir ląstelės dažomos Crystal Violet dažu 30 minučių. Nudažytos ląstelės plaunamos vandeniu ir gerai nusausinamos. Likęs Crystal Violet dažas ištirpinamas KV eliucijos tirpale. 20 µL ištirpinto dažo perkeliama į 96 šulinėlių plokštelę ir praskiedžiama 180 µL PBS tirpalu. Gyvybingumas nustatomas matuojant 585 nm bangos sugertį. Kontrolinių ląstelių sugerties vidurkis prilyginamas 100 % ląstelių gyvybingumo.

2.6.9 Dox patekimo į HCT116 ląsteles vertinimas stebint Dox fluorescenciją

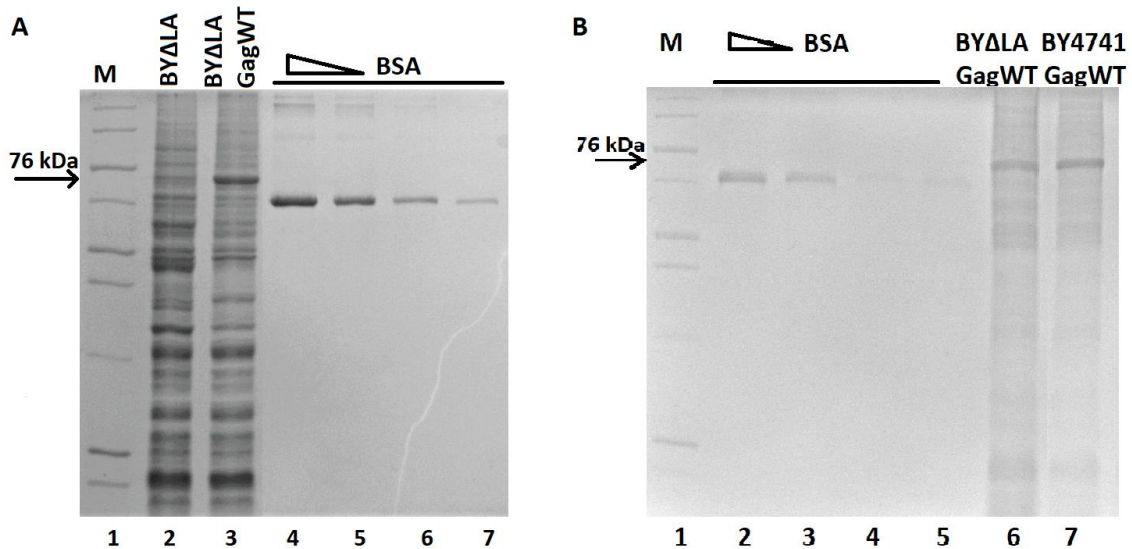
Doksorubicino fluorescencijos ląstelėse stebėjimui naudojamos 6 šulinėlių plokštelės, į kurias HCT116 ląstelės užsėjamos $1,6 \times 10^5$ ląstelių per šulinėlį tankiu įprastoje mitybinėje terpėje ir kultivuojamos 48 valandas. Po kultivacijos ląstelėms pateikiama 100 ng/mL ar 200 ng/mL koncentracijos Dox tirpalo. Į tam tikrus šulinėlius pridedama baltyminio mėginio. Gag baltymo kiekis šulinėliuose yra apie 52 μg (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Ląstelės auginamos dar 48 valandas. Po kultivavimo nuo ląstelių nusiurbiamą terpę, jos 3 kartus praplaunamos PBS tirpalu. Ant ląstelių užpilama 20 μL PBS ir šulinėlis uždengiamas dengiamuoju stikleliu. Ant stiklo užlašinama imersinio aliejaus ir ląstelės stebimos fluorescenciniu mikroskopu per 60x objektyvą. Dox fluorescencija stebima sužadinant 590 nm lazeriu.

3 REZULTATAI

Mokslinio darbo metu buvo siekiama išgryninti *Saccharomyces cerevisiae* L-A-1 viruso formuojamas VLP ir įsitikinti, jog L-A-1 viruso baltymai nedaro neigiamos įtakos HCT116 ląstelių gyvybingumui. Toliau L-A-1 viruso VLP siekta pritaikyti kaip nanonešėjus tikintis, jog VLP lems efektyvesnę doksorubicino patekimą į HCT116 ląsteles. Šiam tikslui pirmiausia reikėjo optimizuoti L-A-1 viruso VLP gryninimą – pasirinkti tinkamą *S. cerevisiae* kamieną, kuriame L-A-1 kapsidės baltymo Gag produkcija būtų didelė, bei pasirinkti tinkamą baltymų gryninimo metodą, kuriuo būtų gaunami dideli kiekiai pakankamai grynų VLP. Nustačius doksorubicino veikimo koncentracijas, šis chemoterapinis vaistas buvo naudojamas kartu su išgrynintomis VLP ir pateikiamas HCT116 ląstelėms. VLP transfekcinis pajėgumas nustatomas vertinant HCT116 ląstelių gyvybingumą kultivuojant jas kartu su Dox bei VLP ir stebint doksorubicino fluorescenciją šiose ląstelėse.

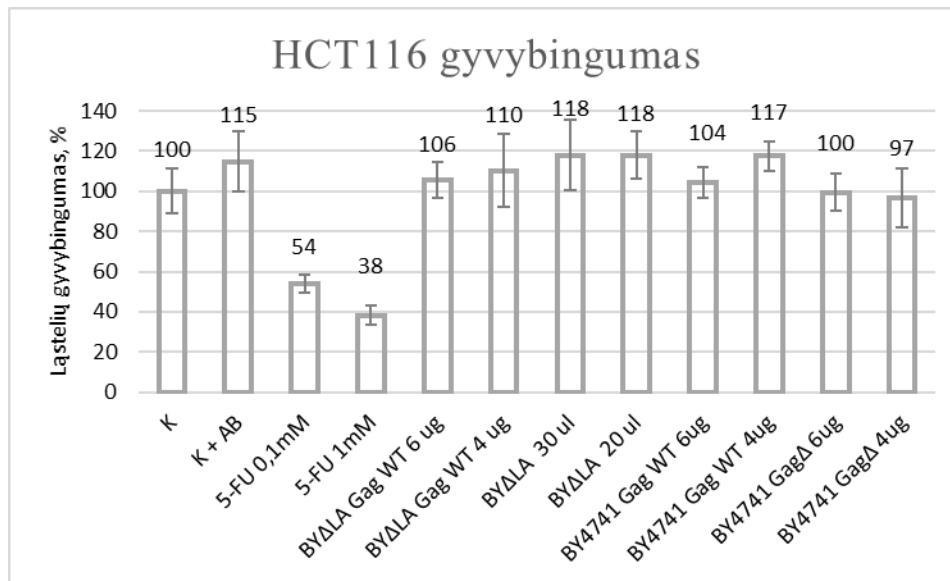
3.1 Virusinių kapsidžių gryninimas ir L-A-1 viruso komponentų citotoksiškumo tyrimas

Norint nustatyti L-A-1 viruso komponentų citotoksiškumą HCT116 ląstelėms, buvo naudoti *S. cerevisiae* BY Δ LA, BY Δ LA GagWT, BY4741 GagWT ir BY4741 Gag Δ kamienai. Ultracentrifugavimo 45 % sacharozės tirpale būdu išgryninus VLP ir atlikus SDS-PAGE elektroforezę ir densitometrinę analizę nustatyta, kad iš 1,5 g BY Δ LA GagWT kamieno biomasės sacharozės pagalvės metodu išskirto Gag baltymo koncentracija siekė 0,07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (7A pav.). Iš 1,62 g BY4741 GagWT kamieno išskirto Gag baltymo koncentracija siekė 0,21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, o iš 1,64 g BY4741 Gag Δ kamieno – 0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (7B pav.).



7 pav. SDS-PAGE geliai. M takeliuose baltyminis dydžio standartas PageRuler Protein Ladder. **A** gelyje: 2 takelyje BYΔLA mėginys, 3 takelyje BYΔLA GagWT baltyminis mėginys. Likusiuose takeliuose kalibracinės kreivės BSA mėginiai (BSA kiekiai šulinėliuose: 1; 0,5; 0,2; 0,1 μg). **B** gelyje: 2 takelyje BY4741 GagΔ ir 3 takelyje BY4741 GagWT baltyminiai mėginiai po ultracentrifugavimo. 4 – 7 takeliuose kalibracinės kreivės mėginiai (BSA kiekiai šulinėliuose: 1; 0,5; 0,2; 0,1 μg).

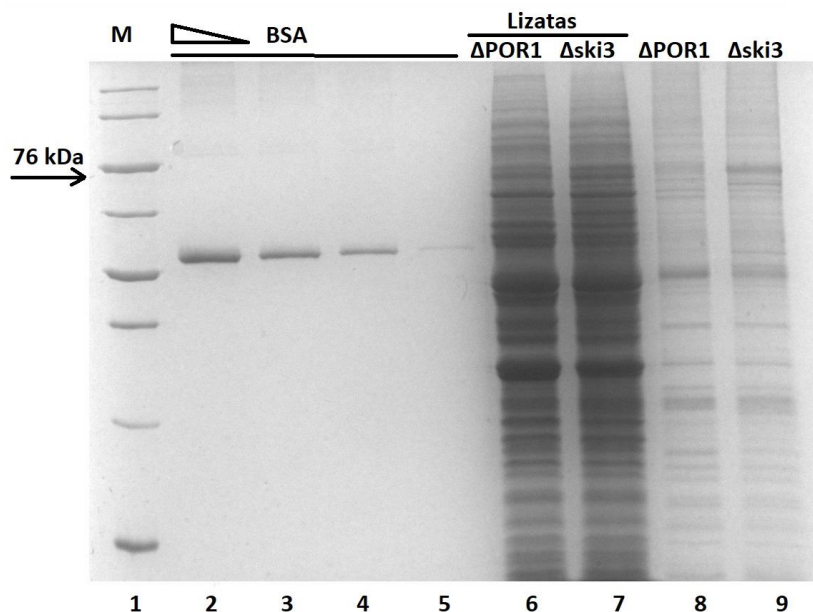
Kadangi *S. cerevisiae* BYΔLA GagWT kamiene pašalintas L-A-1 virusas, o Gag baltymo genas įterptas į plazmidę, kuria transformuotas šis kamienas, Gag baltymo raiška jame turėjo būti mažesnė, nei BY4741 kamienuose. Kaip ir tikėtasi, iš *S. cerevisiae* BY4741 GagWT ir BY4741 GagΔ kamienų Gag baltymo išskirta daugiau, nei iš BYΔLA GagWT kamieno. Šie baltyminius mėginiai su L-A-1 viruso VLP naudoti norint įsitikinti, jog L-A-1 viruso komponentai neturi neigiamos įtakos HCT116 ląstelių gyvybingumui. Galimam citotoksiškumui įvertinti HCT116 ląstelės buvo auginamos su skirtingu Gag baltymo kiekiu bei baltyminiu mėginiu iš kontrolinio *S. cerevisiae* BYΔLA kamieno, neturinčio jokių L-A-1 viruso komponentų. Kontrolinių HCT116 ląstelių, kultivuotų įprastoje augimo terpėje gyvybingumas prilyginamas 100 %. Pagal jas nustatomas ir kitų ląstelių, kultivuotų kartu su 5-FU bei su VLP, gyvybingumas. Teigiamos kontrolės 5-FU šulinėliai naudoti, norint palyginti HCT116 ląstelių gyvybingumą, esant žinomam citotoksiniam poveikiui. Iš literatūros šaltinių žinoma, jog ląstelių gyvybingumas sumažėja apie 50 %, naudojant 0.1 mM 5-FU koncentraciją (Kukcinavičiūtė *et al.*, 2017). Gauti HCT116 ląstelių gyvybingumo rezultatai pateikti 8 pav. Lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, ląstelių, auginamų kartu su L-A-1 viruso VLP, plokštelėje buvo priaugę daugiau. Todėl pagal pateiktus duomenis nustatyta, kad su L-A-1 viruso komponentais auginamos ląstelės buvo ne mažiau gyvybingos nei kontrolinės ląstelės.



8 pav. HCT116 ląstelių gyvybingumas, kultivuojant jas su 6 ir 4 μg Gag baltymo šulinėlyje bei su 30 ir 20 μL baltyminio mėginio iš kontrolinio BY Δ LA kamieno, neturinčio Gag baltymo. Nurodytas HCT116 ląstelių gyvybingumas kultivuojant jas su skirtingomis 5-FU koncentracijomis (0,1mM ir 1mM). K + AB – ląstelės, kultivuotos su ardymo buferiu, kuriame ištirpintas L-A-1 viruso Gag baltymas. n = 3.

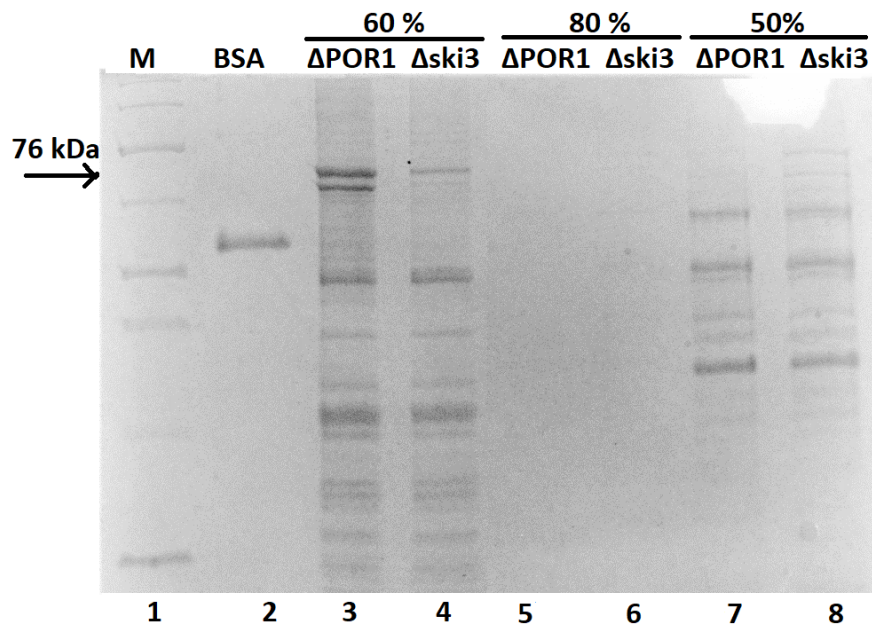
3.2 Didesnio virusinių kapsidžių kiekio gryninimas

Norint gauti didesnę L-A-1 viruso VLP kiekį buvo naudoti BY4741 Δ ski3 ir BY4741 Δ POR1 *S. cerevisiae* kamienai. Dėl Δ ski3 ir Δ POR1 mutacijų šiuose kamienuose yra padidėjęs L-A-1 viruso kiekis, todėl kamienai pasižymi didesne Gag baltymo produkcija. VLP buvo grynintos ultracentrifuguojant šių kamienų lizatą sacharozės gradientu. Išsodinus 60 % sacharozės frakciją, kurioje turėjo likti VLP, antro ultracentrifugavimo metu gauta, kad Gag baltymo, išskirto iš 2,96 g BY4741 Δ ski3 kamieno biomasės, koncentracija siekė 0,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o gryninant VLP iš 2,68 g BY4741 Δ POR1 kamieno biomasės – 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9 pav.). Kartojant bandymą, gauto Gag baltymo koncentracijos buvo: 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ir 0,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, atitinkamai gryninant baltymą iš 2,44 g BY4741 Δ ski3 ir 2,37 g BY4741 Δ POR1 kamienų biomasės.



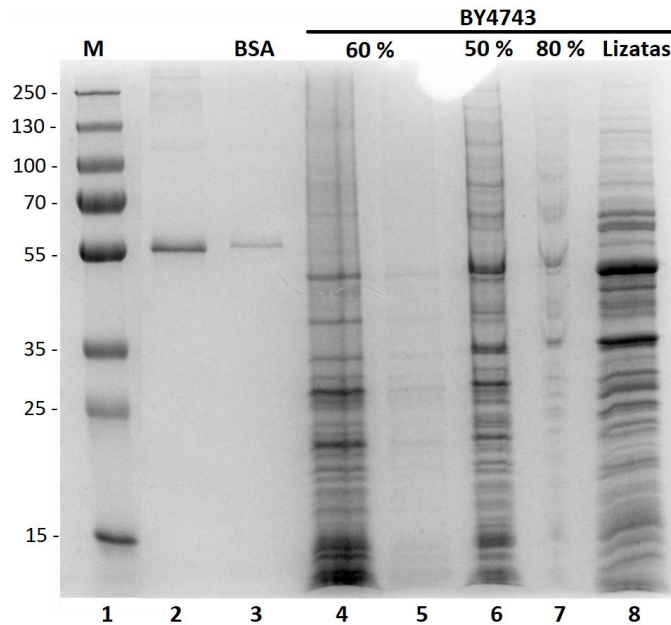
9 pav. SDS-PAGE gelis. M takelyje yra baltyminis dydžio standartas PageRuler Protein Ladder. 2 - 5 takeliuose BSA kalibracinės kreivės mėginiai (BSA kiekiai šulinėliuose: 1; 0,5; 0,2; 0,1 μg), 6,7 takeliuose BY4741 Δski3 ir BY4741 ΔPOR1 kamienų lizato mėginiai. 8,9 takeliuose išsodinta BY4741 Δski3 ir BY4741 ΔPOR1 kamienų 60 % sacharozės frakcija.

Kadangi gauta Gag baltymo koncentracija buvo žymiai mažesnė nei numatyta, buvo surinktos ir toliau analizuojamos visos sacharozės frakcijos, darant prielaidą, kad baltymas pasiskirsto 50 ar 80 % sacharozės frakcijose. Remiantis elektroforetine surinktų frakcijų analize (10 pav.) padaryta išvada, jog Gag baltymas po ultracentrifugavimo sacharozės gradientu vis gi lieka 60 % sacharozės frakcijoje.



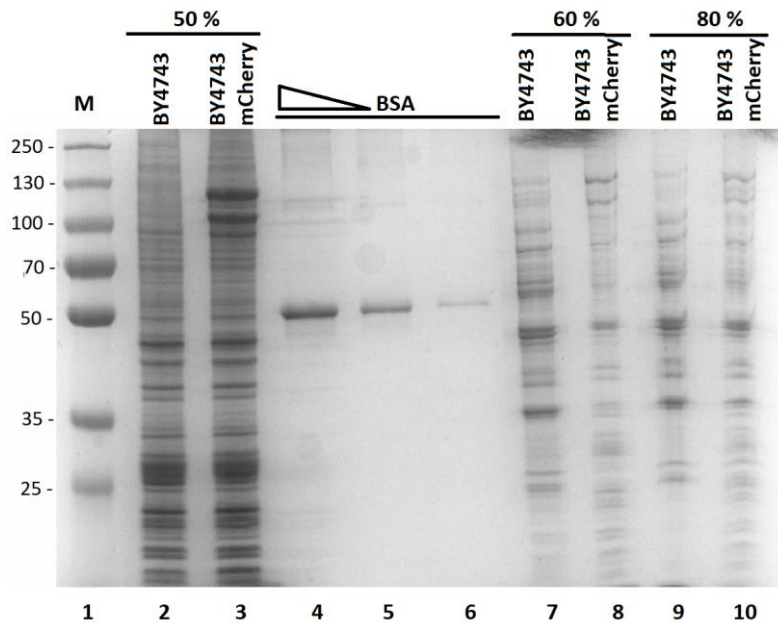
10 pav. SDS-PAGE gelis. 1 takelyje yra baltyminis dydžio standartas PageRuler Protein Ladder. 2 takelyje BSA mėginys (0,5 μ g šulinėlyje), 3 - 4 takeliuose išsodinta 60 % sacharozės frakcija iš BY4741 Δ ski3 ir Δ POR1 kamienų, 5 - 6 takeliuose surinktos 80 %, o 7 - 8 takeliuose 50 % sacharozės gradiento frakcijos.

Kadangi naudojant anksčiau minėtus mielių kamienus išgrynintų virusinių kapsidžių kiekis buvo mažas, buvo panaudotas kitas kamienas, tikintis, jog jame Gag baltymo produkcija yra didesnė. Išsodintoje 60 % sacharozės frakcijoje bei 50 % ir 80 % sacharozės frakcijų, gautų gryninant baltymą iš BY4743 mielių kamieno, analizė (11 pav.) parodė, kad Gag baltymo koncentracija mėginiuose yra labai maža ir densitometrinės analizės būdu tiksliai apskaičiuoti koncentracijos negalima.



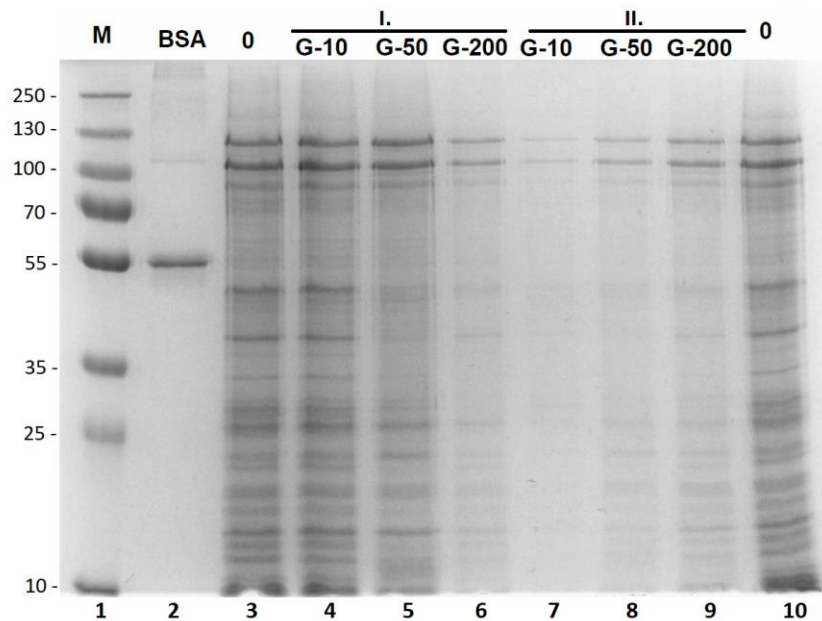
11 pav. SDS-PAGE analizė po Gag baltymo gryninimo iš BY4743 mielių kamieno. 1 takelyje baltyminis dydžio standartas PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, toliau BSA mėginiai (BSA kiekiai šulinėliuose: 0,5; 0,1 µg), 60 % sacharozės frakcija (neskiesta ir skiesta 3 kartus), bei surinktos 80 ir 50 % sacharozės gradiento frakcijos.

Norint įsitikinti, jog virusinės kapsidės nėra prarandamos kažkurioje iš sacharozės gradiento frakcijų ultracentrifugavimų metu, panaudotas *S. cerevisiae* BY4743 Gag-mCherry kamienas. Šiame kamiene produkuojamos VLP fluorescuoja dėl prie Gag baltymo prilieto mCherry fluorescuojančio monomerinio baltymo. Fluorescencija yra tokia stipri, jog spalvos pokyčiai sacharozės gradiente po pirmojo ultracentrifugavimo matomi plika akimi. Iš 3,73 g sausos biomasės, atlikus ultracentrifugavimą sacharozės gradiente, pagal rausvą frakcijos spalvą aiškiai matėsi, jog Gag-mCherry baltymas lieka 50 % frakcijoje. Elektroforetinė mėginių analizė taip pat parodė, jog didžiausia dalis Gag baltymo po ultracentrifugavimo lieka 50 % frakcijoje (12 pav.). Pagal gelio nuotrauką nustatyta, jog BY4743 + Gag-mCherry kamiene Gag-mCherry (100 kDa) baltymo gauta žymiai daugiau nei Gag baltymo (76 kDa) BY4743 kamiene (užaugintos biomasės kiekis – 2,78 g). Apskaičiuota, jog išgryninto Gag-mCherry koncentracija siekia 0.26 µg/µL.



12 pav. SDS-PAGE gelio nuotrauka. M takelyje baltyminis dydžio standartas PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, 2 - 3 takeliuose išsodinta 50 % sacharozės gradiento frakcija iš BY4743 ir BY4743 Gag-mCherry baltyminių mėginių; 4 - 5 takeliuose BSA mėginiai (BSA kiekiai šulinėliuose: 1; 0,5; 0,1 μg), 7 - 8 60 %, o 9 – 10 – 80 % sacharozės frakcijos.

Kadangi Gag-mCherry baltymo buvo gauta daug, tačiau baltyminis preparatas nebuvo pakankamai grynas ir turėjo daug kitų baltymų, jis toliau buvo gryninamas gel-filtracijos metodu naudojant Sephadex sorbentu užpildytas kolonėles. Gryninimo efektyvumo nustatymui buvo pasirinkti skirtingi Sephadex sorbentai (G-10, G-50, G-200). Gryninto baltymo ir praplovimo frakcijų (I. ir II.) mėginiai toliau analizuojami, vykdant SDS-PAGE elektroforezę (13 pav.) Pagal gautus rezultatus nustatyta, jog toliau baltyminių mėginių gryninant su Sephadex G-50 sorbentu, gaunamas šiek tiek grynesnis Gag baltymo preparatas. Naudojant Sephadex G-10 sorbentą, skirtumo tarp gryninto ir negryninto preparato nėra, o naudojant Sephadex G-200 sorbentą, baltyminis mėginys nėra išplaunamas ir užsilaiko kolonėlėje. Toliau gryninant baltymą Sephadex sorbentais buvo pasiektas žemas gryninimo efektyvumas, todėl tolimesniuose darbuose šis metodas nebuvo taikomas.

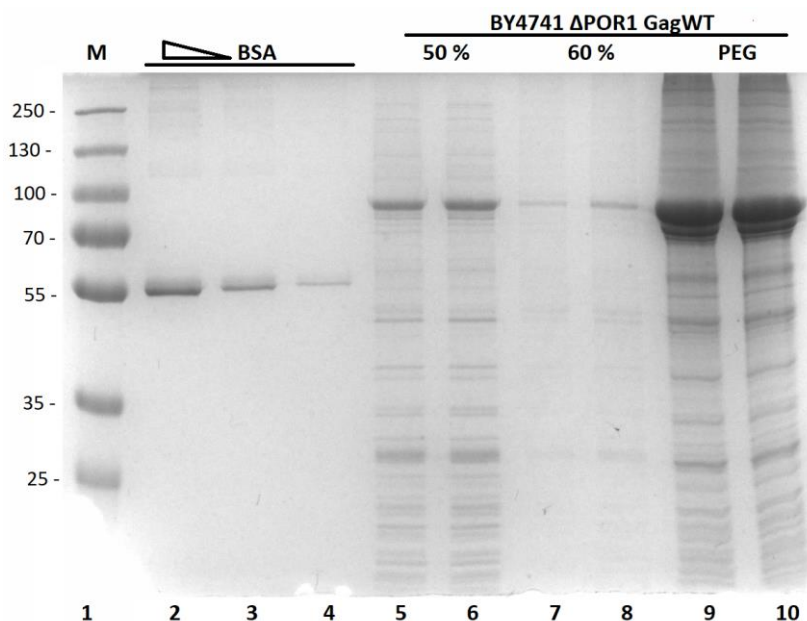


13 pav. SDS-PAGE elektroforezės gelio nuotrauka po baltyminio preparato gryninimo gel-filtracijos metodu. 1 takelyje baltyminis dydžio standartas PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, 2 takelyje BSA mėginys (0,1 µg); 3 ir 10 takeliuose pradinis BY4743 Gag-mCherry baltyminis mėginys, žymimas 0; 4 - 6 takeliuose skirtingais sorbentais (Sephadex G-10, G-50, G-200) gryninti Gag-mCherry mėginiai, 7 - 9 takeliuose kolonėlių praplovimo frakcijos.

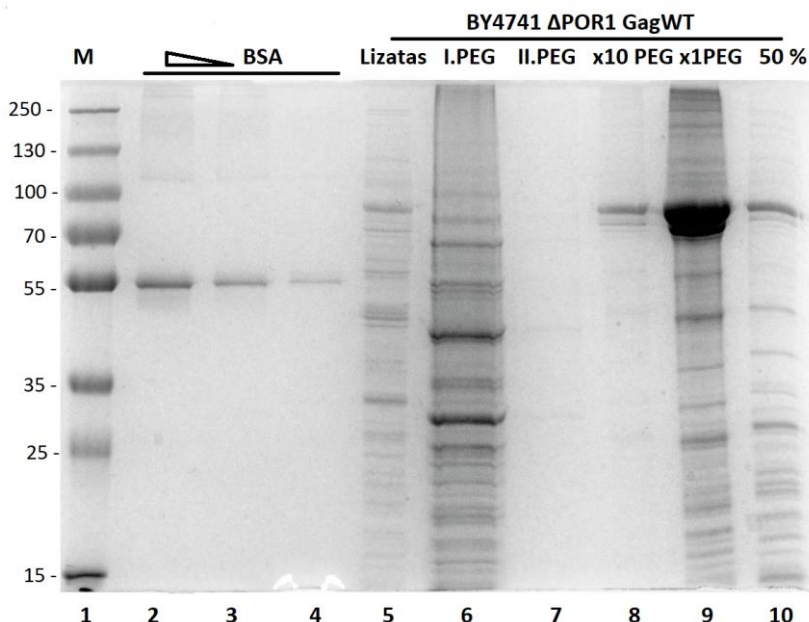
3.3 Virusinių kapsidžių gryninimo būdų palyginimas

Kadangi gryninant Gag baltymą iš skirtingų *Sacharomyces cerevisiae* kamienų sacharozės gradientu nėra gaunamas pakankamas Gag baltymo kiekis bei gautas Gag baltymas turi daug kitų baltymų priemaišų, nuspręsta naudoti kitą gryninimo metodą ir palyginti jį su ultracentrifugavimo sacharozės gradientu metodu. Naudotas BY4741 ΔPOR1 GagWT kamienas, kuriame Gag produkcija mielių ląstelėse labai didelė. Šio kamieno 2 g biomasės lizatas buvo gryninamas ultracentrifuguojant sacharozės gradientu ir naudojant PEG4000 (žr. 2.6.3 skyrių). Po abiejų gryninimo metodų gauti baltyminiai mėginiai analizuoti elektroforetiškai (14 pav.). Nustatyta, jog gryninant Gag baltymą su PEG4000, gaunamas žymiai didesnis baltymo kiekis, nei naudojant ultracentrifugavimo sacharozės gradientu metodu. Elektroforezės gelio nuotraukoje taip pat matosi, jog Gag baltymas migruoja tarp 50 ir 60 % sacharozės frakcijų, o pagal 15 pav. gelio nuotrauką matosi, jog gryninant baltymą su PEG4000, baltymas nėra prarandamas. Taip pat gryninant baltymą su PEG4000, gaunamas žymiai grynesnis Gag baltymo preparatas. Densitometrinės analizės būdu nustatyta, kad gryninant Gag baltymą su PEG4000, jo koncentracija mėginyje siekė 0,65 µg/µL, o gryninant sacharozės gradientu – dešimt kartų mažiau (0,06 µg/µL). Naudojant PEG4000, iš BY4743 ΔPOR1 GagWT kamieno gautas

didelis kiekis virusinių dalelių, kurios pasižymėjo pakankamu grynumu ir buvo naudotos tolimesniuose darbuose.



14 pav. Gag baltymo gryninimo metodų palyginimas. SDS-PAGE gelis, kuriame 1 takelyje yra baltyminis dydžio standartas PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, 2 - 4 – BSA mėginiai (BSA kiekis šulinėliuose: 1; 0,5; 0,2 μg); 5 - 6 išsodinti 50 % ir 7 - 8 išsodinti 60 % sacharozės frakcijų baltyminiai mėginiai. 9 - 10 takelyje – Gag baltymas, grynintas naudojant PEG4000.

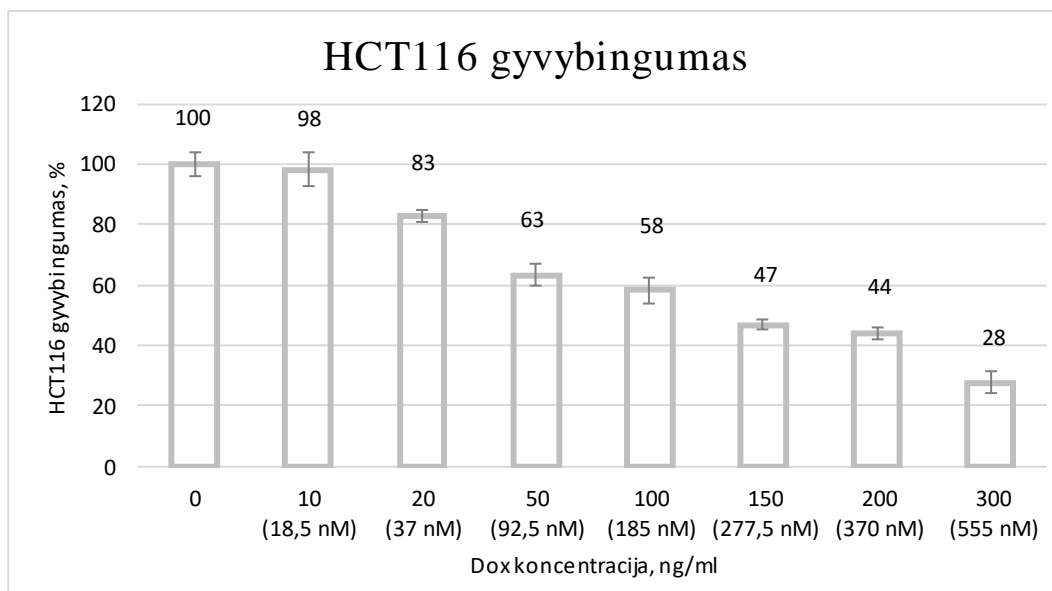


15 pav. Gag baltymo gryninimo metodų palyginimas. SDS-PAGE gelis, kuriame 1 takelyje yra baltyminis dydžio standartas PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, 2 - 4 – BSA mėginiai (BSA kiekis šulinėliuose: 1; 0,5; 0,2 μg); 5 takelyje BY4741 Δ POR1 GagWT kamieno lizatas, 6 takelyje supernatantas gautas po baltyminio mėginio nucentrifugavimo nuo PEG4000 tirpalo. 7 takelyje nuosėdų, gautų po centrifugavimo su

PEG4000 plovimo tirpalas. 8 takelyje išgryninto su PEG4000 Gag mėginys, skiestas 10 kartų. 9 takelyje neskiestas Gag baltymo mėginys, gautas gryninant su PEG4000. 10 takelyje sacharozės gradientu išgryninto Gag baltymo mėginys.

3.4 L-A-1 viruso VLP transfekcinio pajėgumo vertinimas

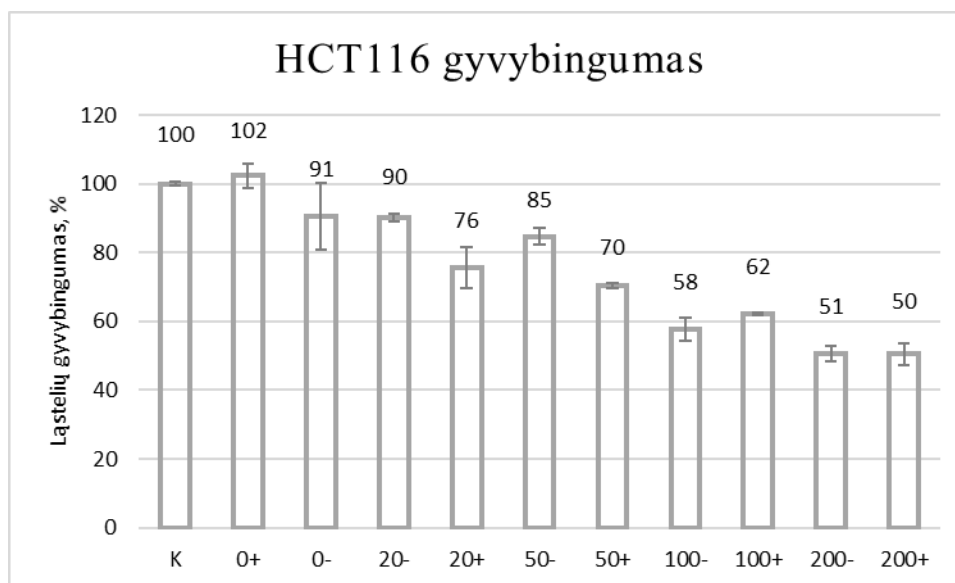
Transfekcinis L-A-1 formuojamų kapsidžių pajėgumas vertinamas pagal VLP gebėjimą efektyviau pateikti doksorubiciną HCT116 ląstelėms. Šiam tikslui pirmiausia buvo nustatomos Dox veikimo ribos: pasirinktos 5 (10-300 ng/ml) doksorubicino koncentracijos. Ląstelių augimas, veikiant Dox, lyginamas su neveiktomis kontrolinėmis ląstelėmis, kurių gyvybingumas prilyginamas 100 %. Rezultatai pateikiami 16 pav. Nustatyta, jog doksorubicino citotoksinis poveikis HCT116 ląstelėms prasideda esant 20 ng/mL Dox koncentracijai. Naudojant 100 – 200 ng/mL Dox koncentraciją, HCT116 gyvybingumas siekia 44 – 58 %.



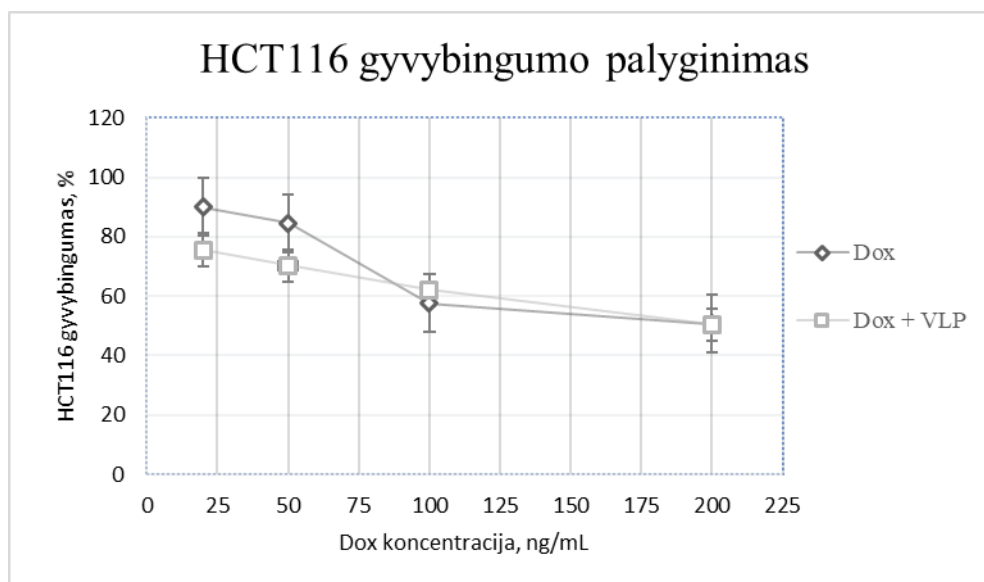
16 pav. HCT116 gyvybingumas, kultivuojant ląsteles su skirtingomis doksorubicino koncentracijomis. Kontrolinės ląstelės kultivuotos augimo terpėje be Dox. n = 3.

Nustačius Dox veikimo ribas, HCT116 kultivacijai su Dox ir L-A-1 viruso kapsidėmis pasirinktos 20, 50, 100 ir 200 ng/mL Dox koncentracijos. Kapsidžių transfekcinis pajėgumas vertinamas ląstelių, kultivuočių su doksorubicinu kartu pateikiant ir L-A-1 formuojamas VLP, gyvybingumą lyginant su ląstelių, kultivuočių tik su Dox. Ląstelėms buvo pateikiama apie 13 µg Gag baltymo šulinėlyje. Gauti rezultatai parodė, jog naudojant 20 ir 50 ng/mL Dox koncentraciją, ląstelių gyvybingumas yra mažesnis, kartu joms pateikiant ir viruso kapsidžių (17 pav.). 20 ir 50 ng/mL Dox koncentracijų ribose, VLP galimai pagerina Dox patekimą į HCT116 ląsteles ir taip padidina jo citotoksinį

poveikį ląstelėms (18 pav.). Naudojant didesnes Dox koncentracijas (100 ir 200 ng/mL), ląstelių gyvybingumas beveik nesiskiria, nepriklausomai nuo to ar jos buvo kultivuotos kartu su viruso kapsidėmis, ar be (17 ir 18 pav.). Tai galimai vyksta dėl ir taip aukštos Dox koncentracijos, sąlygojančios Dox patekimo į ląsteles prisotinimą.

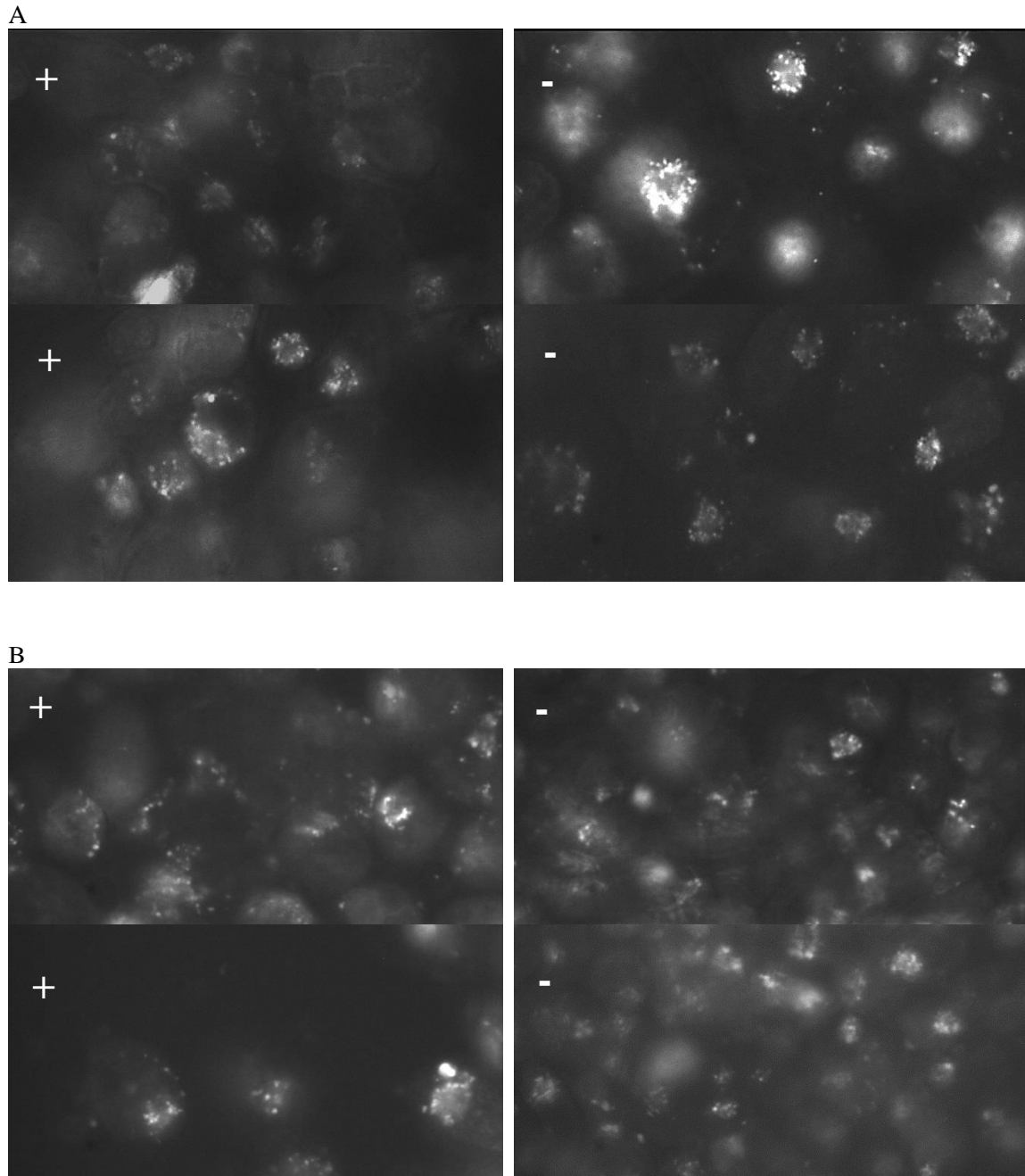


17 pav. HCT116 ląstelių gyvybingumas. Skaičiai nurodo Dox koncentraciją ng/mL. „+“ reiškia, jog šulinėliuose buvo pateikta baltyminio mėginio iš BY4741 ΔPOR1 GagWT kamieno, o „-“ nurodo, jog ląstelės buvo augintos be L-A-1 viruso baltymų. 0- šulinėlyje ląstelėms buvo pateiktas atitinkamas kiekis 1X ardymo buferio tirpalas. n = 2.



18 pav. HCT116 ląstelių gyvybingumo palyginimas. Grafike pavaizduota, kaip kinta HCT116 ląstelių gyvybingumas tarp ląstelių, kultivuočių su Dox, ir ląstelių, kultivuočių su Dox bei L-A-1 viruso VLP (Dox + VLP).

Norint vizualiai pamatyti, jog Dox efektyviai patenka į ląsteles, jas kultivuojant kartu su viruso kapsidėmis, ląstelės buvo stebimos fluorescenciniu mikroskopu. Mikroskopu užfiksuota Dox fluorescencija pavaizduota 19 pav. Rezultatai parodė, jog ląstelėse, kultivuotose su Dox, kartu joms pateikiant viruso kapsidžių, stebima Dox fluorescencija.



19 pav. Dox fluorescencija HCT116 ląstelėse. „+“ ląstelės kultivuotos su L-A-1 viruso kapsidėmis iš BY4741 Δ POR1 GagWT kamieno, „-“ ląstelės kultivuotos be L-A-1 viruso komponentų. A paveiksle naudota 100 ng/mL Dox koncentracija; B Dox koncentracija 200 ng/mL.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Mokslinio darbo metu gauti rezultatai parodė, jog mielių *Saccharomyces cerevisiae* L-A-1 viruso komponentai, kaip ir buvo tikėtasi, nedaro neigiamos įtakos žinduolių ląstelių linijos HCT116 gyvybingumui. Kadangi buvo nustatyta, jog šios dalelės nesukelia citotoksinio poveikio žmogaus ląstelėms, jos gali būti potenciali pernašos sistemos platforma. Kuriant pernašos sistemą, reikia išgryninti daug ir pakankamai grynų VLP. Šio darbo metu nustatyta, jog didžiausia L-A-1 kapsidės Gag baltymo raiška pasiekama naudojant *S. cerevisiae* BY4741 ΔPOR1 GagWT kamieną. Efektyviausias būdas išgryninti didelį kiekį pakankamai grynų L-A-1 viruso VLP buvo atliekant virusinių dalelių gryninimą su PEG4000. Šis dalelių gryninimo būdas yra efektyvesnis už dalelių gryninimą ultracentrifuguojant sacharozės gradientu, o gauti Gag baltymo kiekiai yra 10 kartų didesni. Darbe atlikti HCT116 ląstelių gyvybingumo matavimai bei Dox fluorescencijos ląstelėse stebėjimai parodė, kad Dox efektyviai patenka į HCT116 ląsteles, kultivuojant jas kartu su L-A-1 viruso VLP. Vertinant šių virusinių dalelių transfekcinį pajėgumą, galima teigti, jog Dox lengviau patenka į HCT116 ląsteles, kultivuojant jas kartu su L-A-1 viruso VLP. Citotoksinis Dox poveikis, naudojant mažas jo koncentracijas (20 ir 50 ng/mL), ląstelėms yra didesnis, kai šios kultivuojamos su L-A-1 viruso VLP. Todėl VLP galimai praplečia efektyvią Dox veikimo koncentraciją. Tai galima būtų panaudoti norint sumažinti Dox citotoksinį poveikį sveikiems audiniams. Dox bei kitų chemoterapinių junginių pagrindinis jų naudojimą apribojantis veiksnys – tai jų sukiamas šalutinis poveikis sveikiems audiniams. Doksorubicinas yra toksiškas daugumai pagrindinių organų, taip pat sukelia ypač pavojingą gyvybei kardiotoksiškumą, dėl šios priežasties gydymo procese yra ribojama vaisto dozė (Tacar, Sriamornsak ir Dass, 2013). Panaudojus L-A-1 viruso VLP pernašos sistemą, galima būtų naudoti mažesnes Dox koncentracijas, o modifikuojant šias VLP galima būtų sukurti pernašos sistemas, kurios nuneštų panašius junginius į tikslinius organizmo audinius ar net tikslias vietas ląstelėse. Tai praplėstų tokių junginių kaip Dox panaudojimo galimybes ir padidintų gydymo efektyvumą bei sumažintų šalutinį poveikį. Šiam L-A-1 viruso VLP pritaikymui dar reikia atlikti papildomų tyrimų, kurie parodytų, kaip VLP patenka į ląsteles ir koku būdu perneša įvairius junginius. Taip pat reiktų ištirti chimerinių VLP kūrimo galimybę ir mechanizmus, kuriais tokios VLP atliktų selektyvios pernašos funkciją.

IŠVADOS

- 1) L-A-1 viruso VLP iš *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Δ POR1 GagWT kamieno gryninimo su PEG4000 metodas yra efektyvesnis už gryninimą sacharozės gradientu.
- 2) *Saccharomyces cerevisiae* L-A-1 viruso komponentai nedaro neigiamos įtakos HCT116 ląstelių gyvybingumui.
- 3) L-A-1 viruso VLP galimai pagerina mažų dozių Dox patekimą į HCT116 ląsteles.

Santrauka

Saccharomyces cerevisiae mielės yra saugus organizmas žmogui. Šios mielės jau tūkstančius metų naudojamos įvairių kepinų ir gėrimų fermentacijoje (Landry *et al.*, 2006). 2007 metais atlikto žmogaus mikrobiomo tyrime nustatyta, kad *S. cerevisiae* yra ir sveiko žmogaus natūralios mikrofloros dalis (Nash *et al.*, 2017). Šios mielės svarbios ir plačiai naudojamos maisto (Legras *et al.*, 2007), medicinos, farmacijos pramonėje, biokuro gamyboje (Türker, 2014). *Saccharomyces cerevisiae* yra vienas iš modelinis eukariotinių organizmų, suteikiantis daug žinių apie ląstelėje vykstančius procesus (Landry *et al.*, 2006). Dauguma *Saccharomyces cerevisiae* kamienų turi L-A virusą. Tai 4,6 kb dgRNR virusai, kurie stabiliai palaikomi mielių ląstelėse ir nedaro neigiamos įtakos jų augimui.. Nustatyta, jog L-A-1 kapsidės baltymai formuoja savaime susirenkančias VLP (Fujimura *et al.*, 1992). Tokios pseudoviriono dalelės pritaikomos medicinos pramonėje. Vieni iš VLP panaudojimo būdų, tai pritaikyti jas kuriant įvairias vakcinas arba pernašos sistemas (Fuenmayor, Gòdia ir Cervera, 2017).

Šio mokslinio darbo metu buvo siekta įvertinti galimybę L-A-1 viruso VLP pritaikyti kaip nanonešėjus. Pirmiausia, sacharozės pagalvės metodu gryninant VLP iš *S. cerevisiae* BYΔLA, BYΔLA GagWT, BY4741 GagWT bei BY4741 GagΔ kamienų buvo įsitikinta, jog L-A-1 viruso komponentai nedaro neigiamos įtakos žmogaus vėžinių ląstelių linijos HCT116 gyvybingumui ir jas yra saugu naudoti. Nustatyta, kad didžiausias kiekis L-A-1 viruso VLP produkuojamos BY4741 ΔPOR1 GagWT kamiene, o efektyviausia VLP gryninti naudojant PEG4000. Gryninant L-A-1 viruso VLP naudojant PEG4000, galima pasiekti 10 kartų didesnę išgryninto Gag baltymo koncentraciją, nei gryninant ultracentrifugavimo sacharozės gradientu būdu. Tiriant išgrynintų virusinių dalelių transfekcinį pajėgumą nustatyta, jog esant mažoms Dox koncentracijoms (20 ir 50 ng/ml), citotoksinis Dox poveikis HCT116 ląstelėms yra didesnis, kai ląstelės kultivuojamos kartu su L-A-1 viruso VLP. Todėl galima teigti, jog šios dalelės galimai pagerina Dox patekimą į HCT116 ląsteles esant mažoms Dox koncentracijoms (20 ir 50 ng/ml), taip praplėsdamos efektyvią Dox veikimo koncentraciją. Stebint Dox fluorescenciją veiktose HCT116 ląstelėse, taip pat galima daryti išvadą, jog Dox į ląsteles patenka efektyviai, kai jos kultivuojamos kartu su L-A-1 viruso VLP.

Summary

The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* are safe organisms for humans. These yeasts have been used in the fermentation of various baked goods and beverages for thousands of years (Landry et al., 2006). A 2007 study of the human microbiome found that *S. cerevisiae* is also part of the natural microflora of healthy humans (Nash et al., 2017). This yeast is important and widely used in food (Legras et al., 2007), medicine, pharmaceutical industry and biofuel production (Türker, 2014). *Saccharomyces cerevisiae* is one of the model eukaryotic organisms that provides extensive knowledge of cellular processes (Landry et al., 2006). Most strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry the L-A virus. These are 4.6 kb dsRNA viruses that are stably maintained in yeast cells and do not adversely affect their growth. L-A-1 capsid proteins have been found to form self-assembling VLPs (Fujimura et al., 1992). Such pseudovirion particles are applicable in the medical industry. One of the uses of VLPs is to adapt them to the development of various vaccines or delivery systems (Fuenmayor, Gòdia, & Cervera, 2017).

The aim of this scientific work was to evaluate the possibility of applying L-A-1 virus VLPs as a nanocarriers. In particular, purification of VLP from the strains of *S. cerevisiae* BY Δ LA, BY Δ LA GagWT, BY4741 GagWT, and BY4741 Gag Δ using the sucrose cushion method was used to confirm that L-A-1 virus components do not adversely affect the viability of the human cancer cell line HCT116. The highest levels of L-A-1 virus VLPs were found to be produced in the BY4741 Δ POR1 GagWT strain, and the most efficient VLPs purification method was using PEG4000. Purification method using PEG4000 is 10 times more efficient than purification by sucrose gradient ultracentrifugation according to purified Gag protein concentration. Transfection capacity of purified viral particles showed that at low Dox concentrations (20 and 50 ng / ml), the cytotoxic effect of Dox on HCT116 cells is enhanced when the cells are co-cultured with L-A-1 virus VLP. Therefore, these particles may potentially improve the uptake of Dox into HCT116 cells at low concentrations (20 and 50 ng / ml), thus expanding the effective concentration spectrum of Dox. Monitoring of Dox fluorescence in exposed HCT116 cells also suggests that Dox enters cells efficiently when co-cultured with L-A-1 virus VLPs.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alba-Lois, L. ir Segal-Kischeinevzky, C. (2010) „Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine“, *Scitable by Nature Education*, 3(9). Available at: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/yeast-fermentation-and-the-making-of-beer-14372813/#>.
2. Amersham Pharmacia Biotech AB (1998) *Gel filtration Principles and Methods*. 8th. Sudarè R. Lund. Uppsala, Sweden; Piscataway, N.J.: Amersham Pharmacia Biotech.
3. Carrillo, E. *et al.* (2015) „5-Fluorouracil derivatives: a patent review (2012 - 2014)“, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(10), p. 1–14. doi: 10.1517/13543776.2015.1056736.
4. EL-Banna, A. A., El-sahn, M. A. ir Shehata, M. G. (2011) „Yeasts Producing Killer Toxins: An Overview“, *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 8(2), p. 41–53. doi: 10.1007/s10123-002-0066-z.
5. El-sherbeini, M. ir Bostian, K. A. (1987) „Viruses in fungi : Infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses“, *Microbiology*, 84(6), p. 4293–4297. doi: 10.1073/pnas.84.12.4293.
6. Farid, F. *et al.* (2019) „From Yeast and Fungi. *Saccharomyces cerevisiae*“, Nabavi, S. M. ir Silva, A. S. (sud.) *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier Inc., p. 501–508. doi: 10.1016/B978-0-12-812491-8.00066-7.
7. Fuenmayor, J., Gòdia, F. ir Cervera, L. (2017) „Production of Virus-Like Particles for Vaccines“, *New BIOTECHNOLOGY*. Elsevier B.V., 39(16), p. 174–180. doi: 10.1016/j.nbt.2017.07.010.
8. Fujimura, T. *et al.* (1992) „Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus“, *Nature*, 359(10), p. 746–749. doi: 10.1038/359746a0.
9. Fujimura, T. ir Esteban, R. (2010) „Yeast Double-stranded RNA Virus L-A

- Deliberately Synthesizes RNA Transcripts with 5'-Diphosphate“, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 285(30), p. 22911–22918. doi: 10.1074/jbc.M110.138982.
10. Goffeau, A. *et al.* (1996) „Life with 6000 Genes“, *Science*, 274(October), p. 546–567. doi: 10.1126/science.274.5287.546.
 11. Herskowitz, I. (1988) „Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*“, 52(4), p. 536–553.
 12. <https://www.fpbase.org/> (2019) *Fluorescent Protein Database*. *mCherry*. Available at: <https://www.fpbase.org/protein/mcherry/>.
 13. Johnson, E. A. ir Echavarri-erasun, C. (2011) „Yeast Biotechnology“, *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 5-asis leid. Elsevier B.V., p. 21–44. doi: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3.
 14. Kayikci, O. ir Nielsen, J. (2015) „Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*“, (July), p. 1–8. doi: 10.1093/femsyr/fov068.
 15. Konovalovas, A. (2018) *Mielių Saccharomyces sensu stricto Totiviridae šeimos virusų ciklo ląstelėje molekulinės determinantės*. Vilniaus universitetas.
 16. Kukcinavičiūtė, E. *et al.* (2017) „Effect of mTHPC-mediated photodynamic therapy on 5-fluorouracil resistant human colorectal cancer cells“, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(7), p. 1063–1070. doi: 10.1039/C7PP00014F.
 17. Kupfer, D. M. *et al.* (2004) „Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi“, *EUKARYOTIC CELL*, 3(5), p. 1088–1100. doi: 10.1128/EC.3.5.1088.
 18. Kushnir, N., Streatfield, S. ir Yusibov, V. (2012) „Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development“, *Vaccine*. Elsevier Ltd, 31(1), p. 58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083.
 19. Landry, C. R. *et al.* (2006) „Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*“, *Molecular Ecology*, 15(3), p. 575–591. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02778.x.

20. Legras, J.-L. *et al.* (2007) „Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history“, *Molecular Ecology*, 16, p. 2091–2102. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x.
21. Lgcstandards.org (sine anno) *HCT 116 (Atcc ® Ccl-247TM)*. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-247.aspx?geo_country=ie#generalinformation.
22. Luque, D. *et al.* (2018) „Capsid structure of dsRNA fungal viruses“, *Viruses*, 10(9), p. 1–19. doi: 10.3390/v10090481.
23. Maheshwari, D. ., Dubey, R. C. ir Saravanamurthu, R. (2010) *Industrial Exploitation of Microorganisms*. New Delhi: I. K. International Publisher Pvt. Ltd. Available at: https://books.google.lt/books?id=eqaMzycRTmgC&pg=PR11&hl=lt&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false.
24. Melmer, G. (2005) „Biopharmaceuticals and the Industrial Environment“, Gellissen, G. (sud.) *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., p. 361–383.
25. Mohsen, M. O. *et al.* (2018) „Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System“, *Vaccines*, 6(37), p. 1–12. doi: 10.3390/vaccines6030037.
26. Money, N. P. (2015) „Fungi and Biotechnology“, Prep, M. (sud.) *The Fungi: Third Edition*. 3-asis leid. Miami: Elsevier Ltd., p. 401–424. doi: 10.1016/B978-0-12-382034-1.00012-8.
27. Nash, A. K. *et al.* (2017) „The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort“, *Microbiome*. BioMed Central, 5(1). doi: 10.1186/s40168-017-0373-4.
28. Naskalska, A. ir Pyrc, K. (2019) „Virus Like Particles as Immunogens and Universal Nanocarriers Virus Like Particles as Immunogens and Universal Nanocarriers“, (September).

29. Orentaite, I. *et al.* (2016) „K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*“, *FEMS Yeast Research*, 16(2). doi: 10.1093/femsyr/fow003.
30. Orlean, P. (2012) „Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall“, 192(November), p. 775–818. doi: 10.1534/genetics.112.144485.
31. Powilleit, F., Breinig, T. ir Schmitt, M. J. (2007) „Exploiting the Yeast L-A Viral Capsid for the In Vivo Assembly of Chimeric VLPs as Platform in Vaccine Development and Foreign Protein Expression“, *PLoS ONE*, 2(5). doi: 10.1371/journal.pone.0000415.
32. Rodriguez-Cousino, N. ir Esteban, R. (2017) „Relationships and Evolution of Double- Stranded RNA Totiviruses of Yeasts Inferred from Analysis of L-A-2 and L-BC Variants in Wine Yeast Strain“, *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4), p. 1–18. doi: . [https://doi.org/ 10.1128/AEM.02991-16](https://doi.org/10.1128/AEM.02991-16).
33. Rodriguez-Cousino, N., Gomez, P. ir Esteban, R. (2013) „L-A-lus , a New Variant of the L-A Totivirus Found in Wine Yeasts with Klus Killer Toxin-Encoding Mlus Double-Stranded RNA : Possible Role of Killer Toxin-Encoding Satellite RNAs in the Evolution of“, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), p. 4661–4674. doi: 10.1128/AEM.00500-13.
34. Schmitt, M. J. ir Frank, B. (2002) „The viral killer system in yeast : from molecular biology to application“, *FEMS Microbiological Reviews*, 26(3), p. 257–276. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>.
35. Şereflioğlu, Ş. *et al.* (2017) „Targeted drug delivery and vaccinology approaches using virus-like particles for cancer“, *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47(3), p. 112–119. doi: 10.5152/IstanbulJPharm.2017.0018.
36. Shah, S. *et al.* (2017) „Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films“, *J Photochem Photobiol B.*, 170(5), p. 65–69. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.03.024.Fluorescence.
37. Tacar, O., Sriamornsak, P. ir Dass, C. R. (2013) „Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems“, *Journal of*

- Pharmacy And Pharmacology*, 65, p. 157–170. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
38. Torres, E. R. (2019) *Nucl and Porin influence L-A Killer Virus Loads Co-dependently in Saccharomyces Cerevisiae*. Available at: <https://escholarship.org/content/qt3600s4k4/qt3600s4k4.pdf?t=pwxzyj>.
39. Türker, M. (2014) „Yeast biotechnology: Diversity and applications“, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, p. 323–355. doi: 10.1007/978-1-4020-8292-4.
40. Ungaro, F. *et al.* (2013) „VLPs and particle strategies for cancer vaccines“, *Expert Review of Vaccines*, 12(10), p. 1173–1193. doi: 10.1586/14760584.2013.836909.
41. Vepštaitė-Monstavičė, I. *et al.* (2018) „Saccharomyces paradoxus K66 Killer System Satellite Viruses“, *Viruses*, 10(10). doi: 10.3390/v10100564.
42. Wickner, R. B. (1996) „Double-Stranded RNA Viruses of Saccharomyces cerevisiae“, *FEMS Microbiological Reviews*, 60(1), p. 250–265.
43. Wickner, R. B., Fujimura, T. ir Esteban, R. (2013) *Chapter One - Viruses and Prions of Saccharomyces cerevisiae, Mycoviruses*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5>.
44. Yan, D. *et al.* (2015) „The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles“, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(24), p. 10415–10432. doi: 10.1007/s00253-015-7000-8.
45. Zhao, Q. *et al.* (2011) „Self-Assembled Virus-like Particles from Rotavirus Structural Protein VP6 for Targeted Drug Delivery“, *Bioconjugate Chemistry*, 22(2), p. 1–9.
46. Zhao, R. Y. (2017) „Yeast for virus research“, *Microbial Cell*, 4(10), p. 311–330. doi: 10.15698/mic2017.10.592.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo magistrinio darbo vadovui, prof. dr. Sauliui Servai, už galimybę prisijungti prie laboratorijos kolektyvo ir atlikti praktiką Nukleorūgščių biochemijos laboratorijoje.

Taip pat esu labai dėkinga dr. Aleksandrui Konovalovui už darbe naudotus *S. cerevisiae* mielių konstruktus bei suteiktas praktines ir teorines žinias.

Noriu padėkoti ir dr. Violetai Jonušienei už suteiktas žinias dirbant su HCT116 ląstelių linija, taip pat Vilmantei Žitkutei už šių ląstelių atšildymą ir paruošimą darbui.

Esu dėkinga doc. Aušrai Sasnauskienei už pagalbą dirbant su fluorescenciniu mikroskopu.