



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Jovita Umbrasaitė

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* K2 MIKOCINO IŠSKYRIMAS IR
BIOCIDINIO PROFILIO NUSTATYMAS**

**ISOLATION AND BIOCIDAL PROFILE DETERMINATION OF
SACCHAROMYCES CEREVISIAE K2 MYCOCIN**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2020

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

2020-05-25

(Data)

Jovita Umbrasaitė

**SACCHAROMYCES CEREVISIAE K2 MIKOCINO IŠSKYRIMAS IR
BIOCIDINIO PROFILIO NUSTATYMAS**

**ISOLATION AND BIOCIDAL PROFILE DETERMINATION OF
SACCHAROMYCES CEREVISIAE K2 MYCOCIN**

Baigiamasis magistro darbas

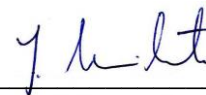
Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovė

doc. dr. Jolanta Sereikaitė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)



(Parašas)

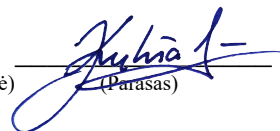
(Data)

2020-05-22

Konsultantė

dr. Juliana Lukša

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)



(Parašas)

(Data)

2020-05-25

Lietuvių kalbos konsultantė BD darbas peržiūrėtas lietuvių kalbos
konsultantės dr. Vaidos Buivydienės

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)



(Parašas)

(Data)

2020-05-22

Vilnius, 2020

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

2020-05-25

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentei Jovitai Umbrasaitė
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: ***Saccharomyces cerevisiae* K2 mikocino išskyrimas ir biocidinio profilio nustatymas**

Patvirtinta 2020 m. balandžio 27 d. dekanų potvarkiu Nr. 127fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2020 m. gegužės 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

1. Optimizuoti *S. cerevisiae* K2 toksino gryninimo schemą;
2. Ištirti K2 toksino biocidines savybes.

Vadovė
(Parašas)

doc. dr. Jolanta Sereikaitė
(Moksl. laipsnis/pedag.vardas, pavardė)

Konsultantė
(Parašas)

dr. Juliana Lukša
(Moksl. laipsnis/pedag.vardas, pavardė)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)
Jovita Umbrasaitė
(Vardas, pavardė)
2018 rugsėjo 28
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Antros pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos magistro baigiamasis darbas
Pavadinimas ***Saccharomyces cerevisiae* K2 mikocino išskyrimas ir biocidinio profilio nustatymas**
Autorė **Jovita Umbrasaitė**
Vadovė **doc. dr. Jolanta Sereikaitė**
Konsultantė **dr. Juliana Lukša**

Kalba: lietuvių

Anotacija

S. cerevisiae sintetinio K2 toksino aptikimas ir analizė yra apsunkinti dėl žemo baltymo sintezės lygio, todėl šiame baigiamajame darbe kuriama efektyvi mikocino išskyrimo ir gryninimo sistema, paremta chromatografijos metodais, bei charakterizuotas negryninto K2 baltymo poveikis prieš gamtinius mikroorganizmus. Šiam tikslui pasiekti sekrecinė terpė, kurioje auginamos *S. cerevisiae* ląstelės, atskirta ir sukonzentruota 25 kartus. Atsižvelgiant į terpėje esančio K2 toksino struktūros ypatybes buvo pritaikyti gelfiltracijos, jonų mainų, hidrofobinės, afininės chromatografijos sorbentai, optimizuotos baltymo sorbavimo ir eliacijos sąlygos. Tikrinant baltymo grynumą elektroforetinės analizės metu bei įvertinant jo aktyvumą, parinkti trys gryninimo etapai, kuriuos sudaro SP-Sepharose katijonų mainų chromatografija, CM Sephadex C50 katijonų mainų chromatografija ir Sephadex G75 gelfiltracija. K2 toksino biocidinės savybės ištirtos prieš 24 skirtingų rūšių mieles, 11 iš jų – jautrios mikocino poveikiui.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis: 64 p. teksto be priedų, 36 iliustr., 6 lent., 71 bibliografinis šaltinis, 3 priedai.

Prasminiai žodžiai: Biocidinis profilis, gelfiltracija, išskyrimas, katijonų mainų chromatografija, K2 mikocinas, *Saccharomyces cerevisiae*

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Master's Graduation Thesis
Title **Isolation and Biocidal Profile Determination of *Saccharomyces Cerevisiae* K2 Mycocin**
Author **Jovita Umbrasaitė**
Academic supervisors **doc. dr. Jolanata Sereikaitė**
dr. Juliana Lukša

Thesis language: Lithuanian

Annotation

The detection and analysis of K2 toxin synthesized by *S. cerevisiae* is complicated due to the low level of protein synthesis. Therefore, in this study, we developed an efficient mycocin isolation and purification steps based on chromatographic methods and characterized the effect of unpurified K2 protein against microorganisms found in nature. To achieve this goal, the synthetic medium in which *S. cerevisiae* cells were grown was isolated and concentrated 25-fold. Considering structural features of K2 toxin in the medium, protein sorption and elution conditions were optimized and different chromatography sorbents (gel filtration, ion exchange, hydrophobic, affinity chromatography) were applied. Three purification steps consisting of SP-Sephacrose cation exchange chromatography, CM Sephadex C50 cation exchange chromatography and Sephadex G75 gel filtration were selected by checking the purity of the protein during electrophoretic analysis and evaluating its activity. The biocidal properties of K2 toxin have been studied against 24 different yeast species, 11 of which are sensitive to mycocin.

The work consists of six parts: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, references.

Structure: 64 p. text without appendixes, 36 pictures, 6 tables, 71 bibliographical entries, 3 appendixes.

Keywords: Biocidal profile, cation exchange chromatography, gel filtration, isolation, K2 mycocin, *Saccharomyces cerevisiae*

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo

2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Jovita Umbrasaitė, 20145009

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-18

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

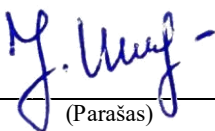
2020 m. Gegužės 20 d.

(Data)

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „*Saccharomyces cerevisiae* K2 mikocino išskyrimas ir biocidinio profilio nustatymas“ patvirtintas 2020 m. balandžio 27 d. dekanų potvarkiu Nr. 127fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo dr. Juliana Lukša. Mano darbo vadovė doc. dr. Jolanta Sereikaitė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.


(Parašas)

Jovita Umbrasaitė

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	9
LENTELIŲ SĄRAŠAS	11
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	12
IVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Biocidinės mielės	14
1.2. Biocidinių mielių ir jų toksinų panaudojimas	15
1.2.1. Biocidinių mielių pritaikymas maisto ir gėrimų pramonėje	15
1.2.2. Toksinus sekretuojančių mielių pritaikymas žemės ūkyje	16
1.2.3. Biocidinių mielių panaudojimas medicinoje	17
1.3. Toksinų gryninimas	18
1.3.1. Šalčiui atsparių mielių <i>Mrakia frigida</i> išskiriamo toksino savybės ir gryninimas ..	19
1.3.2. <i>Williopsis saturnus</i> išskiriamo toksino savybės ir gryninimas	20
1.3.3. <i>Metschnikowia saccharicola</i> išskiriamo toksino savybės ir gryninimas	20
1.3.4. <i>Pichia farinosa</i> išskiriamo SMKT toksino savybės ir gryninimas	21
1.3.5. <i>Pichia anomala</i> WC 65 išskiriamo toksino savybės ir gryninimas	22
1.3.6. <i>Pichia anomala</i> išskiriamo K5 toksino savybės ir gryninimas	23
1.3.7. <i>Schwanniomyces occidentalis</i> išskiriamo toksino savybės ir gryninimas	24
1.3.8. <i>Zygosaccharomyces bailii</i> išskiriamo toksino Zigocino savybės ir gryninimas	25
1.3.9. <i>Kluyveromyces phaffii</i> išskiriamo Kpkt toksino savybės ir gryninimas	26
1.3.10. <i>Kluyveromyces wickerhamii</i> išskiriamo Kwkt toksino savybės ir gryninimas	27
1.3.11. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> išskiriamo K28 toksino savybės ir gryninimas	28
1.3.12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> išskiriamo K1 toksino savybės ir gryninimas	29
1.3.13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> išskiriamo K2 toksino struktūra ir gryninimas	31
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	35
2.1. Medžiagos, tirpalai, prietaisai	35
2.1.1. Medžiagos	35

2.1.2.	Terpės, tirpalai	36
2.1.3.	Mikroorganizmai	37
2.1.4.	Prietaisai	38
2.2.	Metodai	38
2.2.1.	Spektrofotometrinis ląstelių tankio nustatymas	38
2.2.2.	Toksino išskyrimo terpės koncentravimas	39
2.2.3.	SP-Sepharose jonų mainų chromatografija	39
2.2.4.	Dializė.....	39
2.2.5.	CM-Sephadex C-50 jonų mainų chromatografija	39
2.2.6.	Sephadex G75 gelfiltracija	40
2.2.7.	Baltymų elektroforezė	40
2.2.8.	Dažymas su SilverExpress staining rinkiniu	41
2.2.9.	<i>S. cerevisiae</i> K2 toksino biocidiškumo įvertinimas.....	42
2.2.10.	Biocidinio profilio nustatymas	42
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	43
3.1.	Pirmas chromatografinio gryninimo etapas	43
3.2.	Antras chromatografinio gryninimo etapas	46
3.3.	Trečias chromatografinio gryninimo etapas	51
3.4.	K2 toksino biocidinio aktyvumo profilis	54
	IŠVADOS	57
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	58
	PADĖKA	65
	PRIEDAI	66

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. <i>Mrakia frigida</i> 2E00797 toksino gryninimo schema (pagal Liu <i>et al.</i> , 2012).....	19
2 pav. <i>Williopsis saturnus</i> WC91-2 toksino gryninimo schema (pagal Wang <i>et al.</i> , 2012).....	20
3 pav. <i>Metschnikowia saccharicola</i> DD21-2 toksino gryninimo schema (pagal Tan <i>et al.</i> , 2018)	21
4 pav. SMKT toksino gryninimo schema (pagal Suzuki & Shima, 1989)	22
5 pav. <i>Pichia anomala</i> WC 65 išskiriamo toksino gryninimo schema (pagal Sawant <i>et al.</i> , 1989)	23
6 pav. K5 toksino gryninimo schema (pagal Izgü & Altinbay, 2004).....	24
7 pav. <i>S. occidentalis</i> ATCC 44252 toksino gryninimo schema (pagal Chen <i>et al.</i> , 2000)	25
8 pav. Zigocino gryninimo schema (pagal Weiler <i>et al.</i> , 2002)	26
9 pav. Kpkt toksino gryninimo schema (pagal Comitini <i>et al.</i> , 2004)	26
10 pav. Kwkt toksino gryninimo schema (pagal Comitini & Ciani, 2011).....	27
11 pav. K28 preprotoksino struktūra (pagal Santos <i>et al.</i> , 2015)	28
12 pav. K28 toksino veikimo mechanizmas (pagal Schaffrath <i>et al.</i> , 2018).....	28
13 pav. K28 toksino gryninimo schema (pagal Pfeiffer & Radler, 1982).....	29
14 pav. K1 preprotoksino struktūra (pagal Santos <i>et al.</i> , 2015).....	30
15 pav. K1 toksino gryninimo schema (pagal Hutchins & Bussey, 1983).....	30
16 pav. pH įtaka toksino funkcionalumui (pagal Lukša <i>et al.</i> , 2015).....	31
17 pav. Temperatūros įtaka K2 toksino aktyvumui (pagal Lukša <i>et al.</i> , 2015).....	31
18 pav. K2 preprotoksino struktūra (SP – signalinis peptidas, G – glikozilinimo vietos) (pagal Dignard <i>et al.</i> , 1991).....	32
19 pav. K1/K2 toksinų veikimo mechanizmas (pagal Lukša <i>et al.</i> , 2015).....	33
20 pav. K2 toksino gryninimo schema (pagal Lebionka <i>et al.</i> , 2002).....	33
21 pav. Pirmo gryninimo etapo optimalių sąlygų parinkimo schema	43
22 pav. SP-Sepharose gryninimo metu gauta chromatograma. SP-Sepharose kolonėlė (15 mm × 130 mm), nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2). Pilka spalva pažymėta didžiausią aktyvumą turinti frakcija	44
23 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas. 1, 2, 3, 4, 5 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 6 - K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą	45
24 pav. Tris-Glicino SDS poliakrilamidinio gelio (15 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis (žvaigždute pažymėtos atsiskyrusios juostos).....	45

25 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas po hidrofobinės chromatografijos. a - Phenyl-Sepharose, b - Butyl-Sepharose (1,2,3,4,5,6 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 7 – K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą).....	46
26 pav. Antro gryninimo etapo optimalių sąlygų parinkimo schema.....	47
27 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas po afininės chromatografijos. 1 – K2 toksiną sekretuojančių <i>S. cerevisiae</i> mielių kolonija, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – chromatografinio gryninimo frakcijos	47
28 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas po Blue-Sepharose CL-6B chromatografijos (1, 2, 3, 4, 5, 6 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 7 – K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą) ...	48
29 pav. Tris-Tricino SDS poliakrilamidinio gelio (16 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis (žvaigždute pažymėtos atsiskyrusios juostos).....	48
30 pav. CM-Sephadex gryninimo metu gauta chromatograma. Naudojama CM-Sephadex C-50 sorbentu užpildyta kolonėlė (10 mm × 120 mm), nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2). Pilka spalva pažymėtos aktyvumą turinčios frakcijos.....	49
31 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 8 – K2 toksinas po pirmos chromatografijos stadijos ir dializės, 9 – K2 toksinas prieš gryninimą	50
32 pav. Tris-Tricino SDS poliakrilamidinio gelio (16 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis (žvaigždute pažymėtos atsiskyrusios juostos).....	50
33 pav. Baltymo molekulinės masės nustatymas gelfiltracijos metodu. Naudojama Sephadex G75 sorbentu užpildyta kolonėlė (16 mm × 340 mm), nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu su 0,1 M NaCl (pH 4,2) (nizino eliucijos tūris – 65,0 mL, citochromo c – 44,3 mL, chimotripsinogeno – 39,9 mL, karboanhidrazės – 40,0 mL, ovalbumino – 32,5 mL, jaučio serumo albumino – 27,4 mL)	51
34 pav. Gelfiltracijos metu su Sephadex G75 sorbentu gauta chromatograma. Sephadex G75 sorbento kolonėlė (16 mm × 340 mm) nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu su 0,1 M NaCl (pH 4,2). Pilka spalva pažymėta aktyvumą turinti smailė, kurios eliucijos tūris – 22,7 mL.	52
35 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 – chromatografinio gryninimo metu rinkti mėginiai, 10 - K2 toksiną sekretuojančių <i>S. cerevisiae</i> mielių kolonija.....	52
36 pav. Tris-Glicino SDS poliakrilamidinio gelio (15 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis	53

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Biocidinių sistemų pavyzdžiai (pagal Meinhardt & Klassen, 2009)	14
2 lentelė. Darbe panaudotos medžiagos	35
3 lentelė. Darbe panaudoti prietaisai	38
4 lentelė. Tris-Tricino elektroforezės skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio paruošimas	40
5 lentelė. Tris-Glicino elektroforezės skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio paruošimas	41
6 lentelė. K2 aktyvumo tyrimo prieš įvairius gamtinius mikroorganizmus rezultatai (lizės zonų dydžiai, diametras, mm: + + + + (4), + + + (3), + + ± (2,5), + + (2), + ± (1,5), + (1), ± (0,5), - (0))	55

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

APS – amonio persulfatas

BIS – N,N'-metilen-bis-akrilamidas

BSA – Jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*)

CM – karboksimetilo grupė (angl. *carboxymethyl*)

CV – kolonos tūris (angl. *column volume*)

KHR – šilumai atsparus toksinas (angl. *killer of heat resistant*)

KHS – šilumai jautrus toksinas (angl. *killer of heat susceptible*)

HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. *high performance liquid chromatography*)

TEMED – tetrametiletilendiaminas

TRIS – tris (hidroksimetil) aminometanas

SDS – natrio dodecilsulfatas (angl. *sodium dodecyl sulfate*)

SMKT – nuo druskų prilausomas toksinas (angl. *salt mediated toxin*)

SP – sulfopropilo grupė

IVADAS

Kasdien tobulėjančios technologijos, augantys žmonių poreikiai skatina ieškoti būdų, palengvinančių įvairius gamybos procesus maisto pramonėje, žemės ūkyje bei medicinoje. Pastaruoju metu susidomėjimo sulaukė biocidinės mielės (angl. *killer yeast*), išskiriančios baltyminės kilmės toksines medžiagas, kitaip vadinamas mikociniais. Biocidinės mielės pasižymi atsparumu savo sintetinamam toksinui, tačiau yra jautrios kitų mielių toksinams (Golubev, 2006). Mielių savybė išskirti į aplinką toksinus buvo pastebėta 1963 metais, tiriant *Saccharomyces cerevisiae* (Santos, San Mauro & Marquina, 2015). Nuo to laiko mikocinų išskyrimas buvo pastebėtas ir tarp kitų mielių genčių: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Williopsis* ir kt. (Golubev, 2006; Hatoum, Labrie & Fliss, 2012; Santos *et al.*, 2015).

Skirtingų mielių rūšių ir kamienų išskiriami toksinai pasižymi skirtingomis biocheminėmis savybėmis, genų struktūra, molekulinio dydžiu, veikimo mechanizmais (Santos *et al.*, 2015). Biocidinių mielių išskiriami toksinai gali būti koduojami dvigrandės RNR virusų pavidalu, dvigrandėje linijinėje DNR arba chromosomoje. Gera žinoma toksinų veikimo mechanizmai – ląstelių dalijimosi nutraukimas blokuojant DNR sintezę, ląstelės sienelės komponento β -1,3-gliukano sintezės slopinimas bei jonų nutekėjimas, sukeltas dėl citoplazmoje formuojamų kanalų (Hatoum *et al.*, 2012).

Pritaikant mielių išskiriamų toksinų savybes, juos galima panaudoti įvairiose srityse: aplinkos apsaugoje, medicinoje, pramoninėje biotechnologijoje, taip pat baltymų išskyrimo mechanizmų tyrimuose ar siekiant išsiaiškinti toksinų ir jiems jautrių ląstelių sąveiką (Santos, San Mauro, Bravo & Marquina, 2009). Mikocinų pritaikymas įvairiose pramonės srityse skatina ieškoti greito ir paprasto baltymų gryninimo metodo, tačiau kol kas sėkmingai išgrynintų toksinų nėra labai daug (Liu *et al.* 2013). Mikocinams išskirti plačiai naudojami jonų mainų chromatografijos, gelchromatografijos, hidrofobinės chromatografijos ir kiti, papildomi, druskų pašalinimo ir sukonzentravimo metodai (Chen, Han, & Jong, 2000; Comitini & Ciani, 2011; Pfeiffer & Radler, 1982; Sawant, Abdelal, & Ahearn, 1989).

Šio darbo tikslas – išskirti ir charakterizuoti mielių *S. cerevisiae* K2 mikociną.

Uždaviniai:

1. Optimizuoti *S. cerevisiae* K2 toksino gryninimo schemą;
2. Ištirti K2 toksino biocidines savybes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Biocidinės mielės

Mielės – didelė ir heterogeninė mikroorganizmų grupė, kuri dėl biocidinių savybių pastaruoju metu sulaukia vis augančio susidomėjimo. Ši mielių savybė pirmą kartą apibūdinta *S. cerevisiae* mielėse. 1963 metais mokslininkai Bevanas ir Makoweris aprašė biocidinį fenomeną (angl. *yeast killer phenomenon*), tirdami *Saccharomyces cerevisiae* kamieną, izoliuotą iš užkrato alaus gamybos metu (Schmitt & Breinig, 2002). Po šio atradimo biocidinės mielių savybės buvo aprašytos ir kitų genčių mielėse: *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Williopsis*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces phaffii*, *Schwanniomyces occidentalis* ir kt. (Santos *et al.*, 2015).

Remiantis biocidinių mielių atsparumu, toksino veikimo mechanizmais, genetinės determinantės prigimtimi, baltymo molekulinėmis charakteristikomis, mielių biocidinės sistemos gali būti skirstomos į mažiausiai 10 grupių (Chen *et al.*, 2000; Meinhardt & Klassen, 2009). Biocidinių mielių fenotipus nulemiantys genai gali būti koduojami chromosomoje, dvigrandėje RNR (dgRNR) arba linijinėje dvigrandėje DNR (dgDNR) (1 lentelė) (Chen *et al.*, 2000; Meinhardt & Klassen, 2009).

1 lentelė. Biocidinių sistemų pavyzdžiai (pagal Meinhardt & Klassen, 2009)

	Mielių rūšis	Toksinas
Koduojami chromosomoje	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHS, KHR
	<i>Pichia anomala</i>	K5
	<i>Pichia farinosa</i>	SMKT
	<i>Williopsis mrakii</i>	K500
	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	Kwkt
	<i>Kluyveromyces phaffii</i>	Kpkt
	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	
Koduojami dgRNR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K28, K1, K2, Klus
	<i>Ustilago maydis</i>	KP1, KP4, KP6
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Zigocinas
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
	<i>Torulaspora delbruecki</i>	Kbarr-1
Koduojami linijinėje dgDNR	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Zimocinas
	<i>Pichia inositovora</i>	
	<i>Pichia acaciae</i>	PaT
	<i>Debaryomyces robertsiae</i>	

Daugelyje mielių rūšių toksinus koduojančios sekos aptinkamos chromosomose. Labiausiai paplitusios *Kluyveromyces*, *Pichia* ir *Williopsis* mielių biocidinės sistemos (Comitini, Ingeniis De, Pepe, Mannazzu & Ciani, 2004; Santos *et al.*, 2009).

Linijinėse dgDNR plazmidėse koduojami toksinai paplitę tarp bakterijų, augalų ir grybų, o labiausiai – tarp mielių. Jie dažniausiai randami citoplazmoje ir siejami su virusais. Biocidinį fenotipą ląstelėms suteikia dviejų arba trijų linijinių plazmidžių rinkinys. Toksino gamyboje dalyvauja konservatyvūs autonominiai elementai, kurie palaiko genų raišką ir replikaciją. Autonominių ir ne autonominių elementų replikacija inicijuojama DNR polimerazei prisijungus prie 5' terminalinio baltymo, todėl jų replikacijos ir transkripcijos procesai vyksta nepriklausomai nuo šeimininko ląstelės. Skirtinguose organizmuose yra žinomos keturios toksinus koduojančios plazmidės: *Kluyveromyces lactis*, *Pichia inositovora*, *Pichia acaciae* ir *Debaryomyces robertsiae* (Meinhardt & Klassen, 2009).

DgRNR užkoduotas biocidinis fenotipas priklauso nuo satelitinio M viruso ir L-A viruso pagalbininko. M virusas koduoja toksiną, o L-A užkoduoti *GAG* ir *POL* genai užtikrina abiejų virusų replikaciją ir inkapsuliaciją į virusus panašias daleles (angl. *virus-like particles*, *VLPs*). Virionai lieka citoplazmoje, o kadangi jie yra neinfekciniai, dgRNR virusai plinta horizontaliai iš ląstelės į ląstelę arba vertikalios pernašos būdu, formuojantis heterokarionui. DgRNR virusai yra randami *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Ustilago*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora* gentyse (Wickner, Fujimura & Esteban, 2013; Ghabrial, Castón, Jiang, Nibert & Suzuki, 2015).

1.2. Biocidinių mielių ir jų toksinų panaudojimas

Pirmiausiai biocidinės mielės buvo panaudotos maisto ir gėrimų pramonėje ir laikui bėgant šie mikroorganizmai pritaikyti gyvulininkystėje, veterinarijoje, medicinoje bei biomedicinos ir farmacijos pramonėje. Pagrindinis šiose pramonės srityse pritaikomas mielių vaidmuo – kitų mikroorganizmų, pavyzdžiui, nepageidaujamų mielių, pelėsių ir bakterijų slopinimas (Hatoum *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

1.2.1. Biocidinių mielių pritaikymas maisto ir gėrimų pramonėje

Plačiausiai mikocinai naudojami maisto pramonėje, siekiant užkirsti kelią maisto gedimui, patogenų augimui vyno gamyboje, fermentacijos metu. Biocidinės mielės naudojamos alyvuogių fermentacijoje, sojų padažo, alaus, sakės gamyboje (Chen *et al.*, 2000; Hatoum *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Yra žinoma, jog *Debaryomyces hansenii* aktyvumas padidėja aplinkoje esant NaCl, todėl šias mieles siūloma naudoti sūdytuose, fermentuotuose maisto produktuose (Hatoum *et al.*, 2012). *Pichia farinosa* demonstruoja aktyvumą prieš kelias *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* ir *Pichia anomala* mieles, užkratus maisto pramonėje (Suzuki, 2004). Biocidines mieles *Williopsis saturnus* var. *saturnus* siūloma panaudoti sūrio gamyboje. *W.*

saturnus var. *saturnus* išskiriamas toksinas aktyvus prieš sūrio skonį bei kvapą gadinančias, *Saccharomyces cerevisiae* bei *Kluyveromyces marxianus* mieles, ir padeda išvengti sūrio gedimo (Liu & Tsao, 2009).

Vyno gamyboje mikocinai stabdo nepageidaujamų mielių kamienų dauginimąsi, palaiko pastovų gaminamo produkto kvapą, skonį, todėl jų panaudojimas yra ypač aktualus gaminant geros kokybės vynus (Francisco & Ram, 2016). Pastebėta, jog *Wickerhamomyces anomalus* ir *Kluyveromyces wickerhamii* išskiriami toksinai slopina *Dekkera* ir *Brettanomyces* mieles, sukeliančias nemalonius kvapus vynuose (Comitini *et al.*, 2004). Antagonistinės mielių savybės taip pat gali paveikti gamybos procesą vyno gamybos metu. Vyno gamyboje naudojamos bakterijos, kurios obuolių rūgštį (angl. *malic acid*) verčia pieno rūgštimi – vyksta malolaktinė fermentacija (angl. *malolactic fermentation*). Sąveika tarp vyno mielių *Oenococcus oeni* ir tokių bakterijų gali paskatinti arba sutrukdyti malolaktinę fermentaciją, nuo kurios priklauso vyno kokybė bei stabilumas (Hatoum *et al.*, 2012). PMKT2 ir *Pichia membranifaciens* CYC 1086 toksinai pasižymi aktyvumu prieš vyno kokybę gadinančias *Brettanomyces bruxellensis* mieles, todėl gali būti panaudoti vyno gamybos biokontrolėje (Santos, *et al.*, 2009). Sujungus toksiną išskiriantį *S. cerevisiae* kamieną su etanolį išskiriančiu *S. cerevisiae* kamieniu, gauti hibridai, kontroliuojantys patogenus etanolio fermentacijos metu dektrozėje, melasoje, taip pat biomasės apdirbimo metu (Bajaj & Sharma, 2010).

1.2.2. Toksinus sekretuojančių mielių pritaikymas žemės ūkyje

Ūkininkai nuolat susiduria su įvairiomis dirvožemio, grūdų, augalų bei kitų auginamų produktų ligomis. Dėl patogenų sukeltų ligų patiriami dideli pasėlių nuostoliai, atsiranda grėsmė maisto gamybai, saugumui bei stipriai paveikiama pasaulio ekonomika (Ferraz, Cássio & Lucas, 2019). Siekiant užkirsti kelią augalų ligoms ir apsaugoti pasėlius nuo patogenų, naudojami cheminiai metodai. Tačiau dėl dažno fungicidų naudojimo išsivysto patogenų atsparumas, o nenaudojant jokių kontrolinių priemonių, patogenai sparčiai plinta dirvožemiuose. Be to, fungicidai neigiamai veikia žemės ūkio ekosistemų mikroflorą, naikindami naudingus mikroorganizmus bei dirvožemio gyvūnus. Nuolat naudojant fungicidus, aplinkoje išlieka maži cheminių medžiagų kiekiai, sukeliantys nedidelį toksiškumą ir įvairių rūšių užterštumą (Ferraz *et al.*, 2019; Taqarort *et al.*, 2008).

Biologinės kontrolės metodai siūlomi kaip galima alternatyva fungicidams (Comitini & Ciani, 2011). Mielės yra patrauklūs mikroorganizmai biologinei kontrolei, nes jos greitai auga ir kolonizuoja daugelį paviršių, taip ribodamos patogenų naudojimąsi maisto medžiagomis (Taqarort *et al.*, 2008). Mielės į aplinką išskiria priešgrybelinius junginius, įvairius toksinus bei lakias medžiagas. Pavyzdžiui, šaltalankiuose rastos *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus*

wieringae, *Metschnikowia fructicola* ir *Cryptococcus albidus* mielės į aplinką išskiria esterius, alkoholius, lakias riebalų rūgštis, ketonus, aromatinius junginius. Mielių išskiriami lakieji junginiai skatina augalų augimą ir pagerina pasėlių derlingumą (Lukša *et al.*, 2020).

Mielių antagonistines savybes siūloma pritaikyti įvairiose žemės ūkio srityse. Patogenų sukeltos citrusinių vaisių ligos sukelia ekonominius nuostolius visame pasaulyje (Taqaarort *et al.*, 2008). *Pichia anomala* (YT73), *Debaryomyces hansenii* (YT22) ir *Hanseniaspora guilliermondii* (YT13) mielės 80 % sumažina grybo *Penicillium digitatum* Sacc. sukeliamų ligų citrusiniuose vaisiuose paplitimą (Taqaarort *et al.*, 2008). Iš vyno išskirtas *S. cerevisiae* kamienas apsaugo obuolius nuo *Penicillium expansum* pelėsio (Scherm *et al.*, 2003). Neseniai *Pichia membranifaciens* toksinas (PMKT2) pasiūlytas mielių ir filamentinių grybų kontrolei žemės ūkio srityje. PMKT2 aktyvus prieš vynuogių patogenus *Botrytis cinerea* 20003, *Pichia membranifaciens* CYC 1070, kukurūzų patogeną *Fusarium proliferatum* MM 1-2 (Santos *et al.*, 2009). Šis mikocinas pasižymi aktyvumu prieš *Dekkera bruxellensis* ir taip yra stabilus vyno pH bei temperatūros diapazone, todėl toksiną taip pat siūloma panaudoti vyno gamyboje (Comitini & Ciani, 2011). Kakavmedžius Centrinėje ir Pietinėje Amerikoje parazituojantis *Moniliophthora perniciosa* grybas sukelia ligą, vadinamą „raganos šluota“ (angl. *witches' broom disease*). Iš sveikų kakavos augalų išskirtas *Gliocladium catenulatum* 70 % sumažino šios ligos pasireiškimą kakavos daiguose (Ferraz *et al.*, 2019).

Kai kurios mielių rūšys jau pasiekusios rinką kaip komerciniai augalų patogenų kontrolės produktai. Pavyzdžiui, *Aureobasidium pullulans* mielės – kaip „BoniProtect“ (Wagner *et al.*, 2013), *Candida oleophila* kaip „Aspire“, *Cryptococcus albidus* „Yieldplus“, *Metschnikowia fructicola* 277 „Shemer“, *Candida oleophila* O „Nexy“ (Lugtenberg, 2015).

1.2.3. Biocidinių mielių panaudojimas medicinoje

Aktuali šių laikų problema – padidėjęs bakterijų atsparumas antibiotikams – skatina ieškoti naujų gydymo alternatyvų. Medicinoje pirmą teigiamą biocidinių mielių poveikį 1909 m. pastebėjo Hayduckas ir Fernbachas. Jie pranešė apie mielių išskirtą lakų toksišką junginį, kuris trukdė *Escherichia coli* ir *Staphylococci* augimą (Viljoen, 2006). Įrodytas *Debaryomyces hansenii* išskiriamo toksino aktyvumas prieš *Clostridium tyrobutyricum* ir *Clostridium butyricum*. Iš prancūziško sūrio išskirtos *Geotrichum candidum* mielės slopina *Listeria* bakterijas (Hatoum *et al.*, 2012). Siūloma biocidinių mielių išskiriamus mikocinus naudoti prieš žmogaus patogenines mieles, pavyzdžiui, prieš *Candida albicans* ar *Cryptococcus neoformans*, kurių infekcijas sunku išgydyti įprastiniais priešgrybeliniais vaistais (Schaffrath, Meinhardt & Klassen, 2018; Magliani *et al.* 2004). Pavyzdžiui, *Wickerhamomyces anomalus* K5 toksinas, kuris žudo *Trichosporon*, *Microsporum* ir *Candida* rūšis. Manoma, jog toksinas gali būti

panaudojamas kaip vietinio veikimo priešgrybelinis vaistas (İzgül, Altınbay & Türeli, 2007). Dėl panašumo į priešgrybelinį antibiotiką Akuleaciną A ir stabilumo pH bei temperatūros pokyčiuose, *Williopsis mrakii* toksinas pasiūlytas naudoti kaip priešgrybelinis vaistas prieš *Candida spp.* (Walker, Mcleod & Hodgson, 1995; Hodgson, Button & Walker, 1995). Mielių *Zygosaccharomyces bailii* išskiriamas toksinas Zigocinas žudo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* ir *Sporothrix schenckii* mieles. Šią savybę galima pritaikyti kuriant vaistus prieš patogeninių mielių sukeltas infekcijas (Hatoum *et al.*, 2012).

Norint mielių toksinus tiesiogiai taikyti kaip vaistus, susiduriama su iššūkiais. Mielių toksinai yra nestabilūs arba neaktyvūs 37 °C temperatūroje bei neutraliame pH, kuris būdingas žmogaus organizmui (Schaffrath, *et al.*, 2018). Kita problema – į žmogaus organizmą patekęs toksinas gali sukelti stiprų imuninį atsaką. Todėl mokslininkai susintetino mažus ne antigeninius peptidus, pasižyminčius toksinų aktyvumu, įrodytu prieš patogenus *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii* (Magliani, Conti, Travassos & Polonelli, 2008). Taip pat panaudojo *W. anomalus* išskiriamo toksino anti-idiotipinius antikūnus, kurie žudo patogenus sąveikaudami su receptoriais – β-gliukanais (Hatoum *et al.*, 2012; Schaffrath *et al.*, 2018; Polonelli, Magliani, Ciociola, Giovati & Conti, 1991).

Biocidinės mielių sistemos – efektyvus ir nebrangus įrankis mielių identifikavimui bei biotipavimui. Pirmą kartą biocidinės mielės panaudotos *Candida albicans* atpažinimui (Polonelli *et al.*, 1991). Sukurti metodai *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudallescheria boydii* mieles, taip pat prieš *Penicillium camembertii*, *Aspergillus niger* gybus ir *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis* bakterijas (Meinhardt & Klassen, 2009).

1.3. Toksinų gryninimas

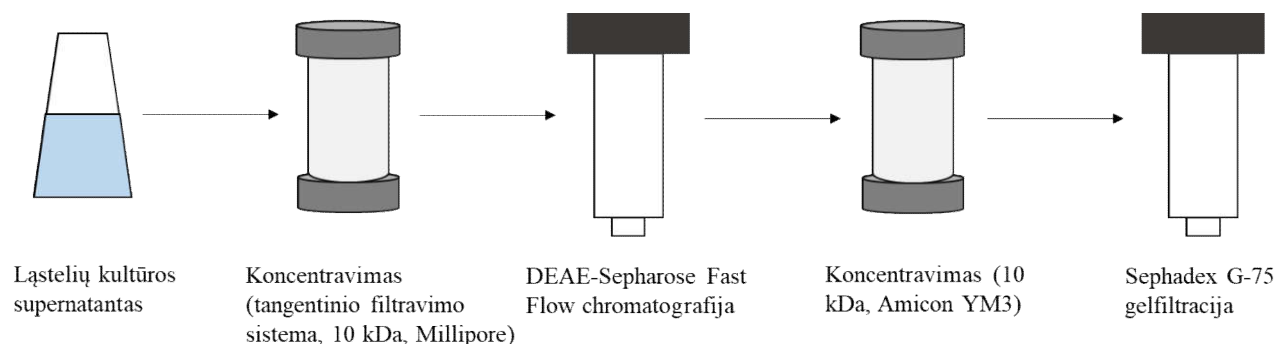
Siekiant panaudoti toksinų savybes medicinoje, biotechnologijoje, žemės ūkyje, moksliniuose tyrimuose ir kitose srityse, svarbu gauti išgrynintą ir aktyvų baltymą. Jau yra išgryninti jūros mielių *Mrakia frigida* (Liu, Wang, Hua, Buzdar & Chi, 2012), *Williopsis saturnus* (Wang *et al.*, 2012), *Metschnikowia saccharicola* (Tan *et al.*, 2018) išskiriami toksinai. Jų panaudojimas aktualus jūrinių gyvūnų ligų prevencijoje. Išgrynintas halotolerantinių mielių *Pichia farinosa* SMKT toksinas (Suzuki & Shima, 1989) naudingas sojos, daržovių fermentacijose. Išgryninti ant uogų, vaisių, dirvožemiuose randamų mielių toksinai: *Pichia anomala* WC65 išskiriamas toksinas (Sawant *et al.*, 1989), *Pichia anomala* K5 toksinas (İzgül & Altınbay, 2004), *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 44252 toksinas (Chen *et al.*, 2000), *Zygosaccharomyces bailii* išskiriamas Zigocinas (Weiler, Rehfeldt, Bautz & Schmitt, 2002),

Kluyveromyces phaffii Kpkt toksinas (Cominiti, 2004) ir *Kluyveromyces wickerhamii* Kwkt toksinas (Comitini & Ciani, 2011), *S. cerevisiae* išskiriami K28 (Pfeiffer & Radler, 1982) ir K1 (Hutchins & Bussey, 1983) toksinai. Jų panaudojimas aktualus įvairiose maisto, gėrimų, žemės ūkio, medicinos srityse.

Toksinų gryninimas glaudžiai susijęs su baltymo savybėmis, jo struktūra, sąveika su ląstelių receptoriais, žudymo mechanizmais, veikimo sąlygomis. Gryninimo metu svarbu parinkti sąlygas, kurios nesutrukdytų baltymo stabilumui bei aktyvumo pasireiškimui (Schaffrath *et al.*, 2018).

1.3.1. Šalčiui atsparių mielių *Mrakia frigida* išskiriamo toksino savybės ir gryninimas

Šalčiui atsparios *Mrakia frigida* 2E00797 mielės, išskirtos iš Antarktikos jūros nuosėdų, sintetina 55,6 kDa dyžio toksiną. Didžiausias toksino aktyvumas pasireiškia 3 % NaCl koncentracijoje, pH 4,5 bei 16 °C temperatūroje. Baltymas išlieka stabilus 10 – 25 °C temperatūroje. Baltymo pI ir veikimo mechanizmas kol kas neištirti. Mokslininkai išgrynino toksiną anijonų chromatografijos ir gelfiltracijos metu (1 pav.) (Liu *et al.*, 2012).

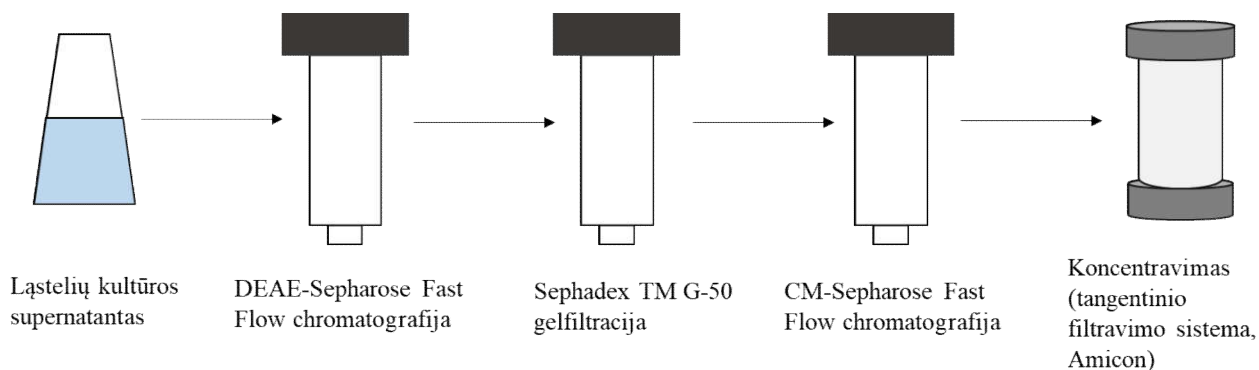


1 pav. *Mrakia frigida* 2E00797 toksino gryninimo schema (pagal Liu *et al.*, 2012)

Pirmiausia ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir sukonzentruotas ultrafiltracijos metu. Toksinas grynintas naudojant anijonito DEAE Sepharose Fast Flow kolonėlę, prieš tai nulygsvarintą 0,02 M citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu. Eksperimento metu buferinio tirpalo pH 4,5, esant kuriam pasireiškia didžiausias toksino aktyvumas. Aktyvumą turinčios frakcijos sujungtos, sukonzentruotos ultrafiltracijos metu ir toliau grynintos gelfiltracijos būdu. Eksperimento metu naudojama Sephadex G-75 kolonėlė, nulygsvarinta 0,02 M citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu (pH 4,5). Iš 750 mL terpės gauta 5,75 mg baltymo, kurio grynumą mokslininkai patvirtino elektroforetiškai. Išgrynintas toksinas gali būti panaudojamas prieš patogeninių *Metschnikowia bicuspidata*, *Candida tropicalis* ir *Candida albicans* mielių sukeltas ligas (Liu *et al.*, 2012).

1.3.2. *Williopsis saturnus* išskiriamo toksino savybės ir gryninimas

Jūrų mielės *Williopsis saturnus* WC91-2 išskiria 11 kDa dydžio toksiną. Didžiausias toksino aktyvumas stebimas pH 3 – 3,5, 16 °C temperatūroje ir esant 10 % NaCl. Baltymo veikimo mechanizmas nežinomas (Wang *et al.*, 2012). Toksinas išgrynintas trijų chromatografinių žingsnių metu (2 pav.).

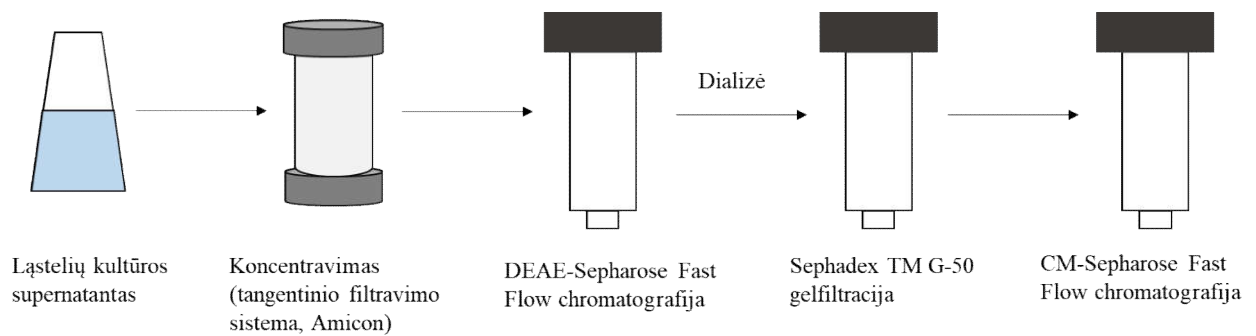


2 pav. *Williopsis saturnus* WC91-2 toksino gryninimo schema (pagal Wang *et al.*, 2012)

Ląstelių kultūros supernatantas sukoncentruotas ultrafiltracijos metu per membraną (pralaidumas nuo 5 kDa) toliau grynintas anijonų mainų chromatografijos metu. Naudojama DEAE Sepharose Fast Flow kolonėlė, nulygsvarinta 20 mmol/L citratiniu-fosfatiniu buferiniu tirpalu. Buferinio tirpalo pH 4,5 – optimalus toksino aktyvumui. Toksinas prie sorbento neprisikabino, todėl surinktas eliuatas toliau grynintas gelfiltracijos būdu. Sephadex G-50 kolonėlė prieš tai nulygsvarinta 50 mmol/L citratiniu-fosfatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,5). Aktyvumą turinčios frakcijos apjungtos, o likusios priemaišos pašalintos gryninant per katijonito CM-Sepharose Fast Flow kolonėlę, nulygsvarintą 20 mmol/L citratiniu-fosfatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,5). Frakcijos, turinčios aktyvumą, sukoncentruotos filtruojant per membraną (pralaidumas nuo 3 kDa). Iš 5 L terpės mokslininkai išgrynino 0,5 mg elektroforetiškai homogeninio baltymo, aktyvaus prieš krabų ligas sukeliančias *Metschnikowia bicuspidata* WCY mieles (Wang *et al.*, 2012).

1.3.3. *Metschnikowia saccharicola* išskiriamo toksino savybės ir gryninimas

Jūrinės mielės *Metschnikowia saccharicola* DD21-2, išskirtos iš Yalu upės nuosėdų, sintetina 47 kDa dydžio toksiną. Optimali toksino aktyvumo temperatūra 16 °C, o pH 5,5. Baltymas stabilus pH 4,0 – 6,5 ir 0 – 40 °C temperatūroje. Toksinas veikia jautrias ląsteles prisijungdamas prie ląstelių receptorių, pažeisdamas ląstelės vientisumą (Tan *et al.*, 2018). Mokslininkai išgrynino toksiną trijų chromatografinių žingsnių metu (3 pav.).



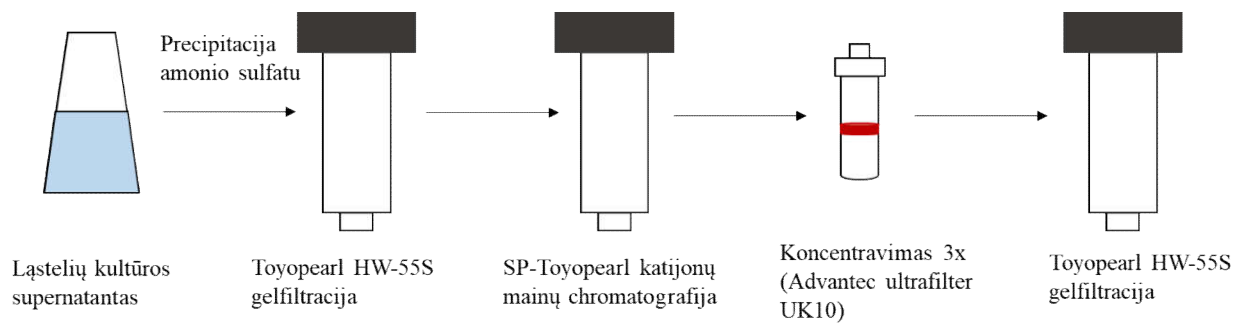
3 pav. *Metschnikowia saccharicola* DD21-2 toksino gryninimo schema (pagal Tan *et al.*, 2018)

Prieš gryninimą ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir sukonzentruotas ultrafiltracijos metu. Toksinas grynintas anijonų mainų chromatografijos metu su DEAE-Sepharose Fast Flow kolonėle, nulygsvarinta 0,02 M citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu. Gryninimo metu buferinio tirpalo pH 5,0, kuriam esant toksinas nepraranda aktyvumo. Toksinas nepriskiriasi prie sorbento ir eliuavosi su lygsvarinimo buferiniu tirpalu. Frakcijos surinktos ir dializuotos per žarnelę (pralaidumas nuo 7 kDa). Toksinas toliau grynintas gelfiltracijos metu naudojant Sephadex TM G-50 kolonėlę, nulygsvarintą 0,05 M citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu (pH 5,0). Siekiant atsikratyti priemaišų, aktyvumą turinčios frakcijos sujungtos ir grynintos katijonų mainų chromatografijos metu naudojant CM-Sepharose Fast Flow kolonėlę, nulygsvarintą 0,02 M citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu (pH 5,0). Toksinas eliuotas pritaikius linijinį NaCl gradientą 0 – 1 M koncentracijos. Iš 1,5 L terpės gauta 3,8 mg baltymo. Straipsnio autoriai išgrynino ir charakterizavo *Metschnikowia saccharicola* DD21-2 mielių išskiriamą toksiną, kuris gali būti panaudojamas jūros gyvūnų patogeninių ligų biokontrolėje (Tan *et al.*, 2018).

1.3.4. *Pichia farinosa* išskiriamo SMKT toksino savybės ir gryninimas

Halotolerantių mielių *Pichia farinosa* KK1 kamieno išskiriamas SMKT toksinas pasižymi didžiausiu aktyvumu esant aukštomis druskų koncentracijoms (2 M NaCl/KaCl). Chromosomoje koduojamas 222 aminorūgščių SMKT preprotoksinas, sudarytas iš hidrofobinio α subvieneto (63 aminorūgščių), vidinio γ fragmento (62 aminorūgščių) ir hidrofilinio β subvieneto (77 aminorūgščių). Subrendęs toksinas – α (6,6 kDa) ir β (7,9 kDa) heterodimeras. Baltymo pI = 6,4. Toksinas išlieka stabilus pH 2,0 – 5,0, temperatūroje nuo 5 iki 30 °C (Suzuki & Nikkuni, 1994). Nėra žinoma su kokiais ląstelės receptoriais sąveikauja toksinas, tačiau siūlomas žudymo mechanizmas – membranos laidumo keitimas (Suzuki & Nikkuni, 1999).

Pichia farinosa mielių išskiriamas mikocinas išgrynintas trijų žingsnių chromatografijų metu (4 pav.).



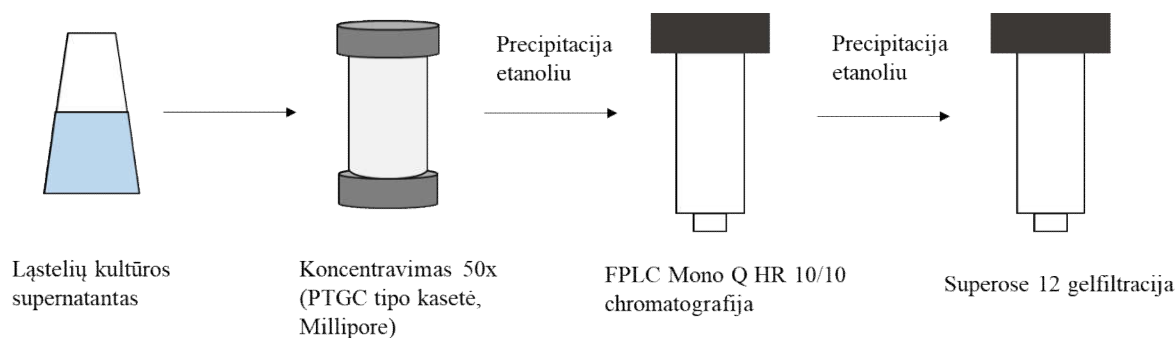
4 pav. SMKT toksino gryninimo schema (pagal Suzuki & Shima, 1989)

Prieš chromatografinį gryninimą, ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir toksinas išsodintas su amonio sulfatu. Susidariusios nuosėdos ištirpintos 20 mM citratiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 3,5). Chromatografija vykdoma trim etapais iš pradžių naudojant Toyopearl HW-55S sorbentą, parinkus optimalias sąlygas (pH 3,5) kolonėlės veikimui ir toksino aktyvumui (pH 2,5 – 4,0). Toksinas eliuojamas 20 mM citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu su 0,15 M NaCl (pH 3,5). Antrame gryninimo etape aktyvumą turinčios frakcijos grynintos SP-Toyopearl katijonų mainų chromatografijos metu. Siekiant toksino prisijungimo prie katijonito, naudojamas pH 3,5. Baltymas eliuojamas pritaikius linijinį NaCl gradientą nuo 0,15 iki 0,8 M koncentracijos. Aktyvumas aptiktas 0,43 – 0,53 M NaCl frakcijose. Toksino frakcijos 3 kartus sukonzentruotos ultrafiltravimo sistema ir grynintos gelfiltracijos būdu per Toyopearl HW-55S kolonėlę, nulygsvarintą 0,1 M amonio acetato buferiniu tirpalu (pH 3,5). Toksino eliucija vykdoma tuo pačiu buferiniu tirpalu. Po trijų gryninimo etapų mokslininkai išgrynino toksiną, nustatė jo švarumą ir dydį elektroforetinės analizės metu (25 kDa). Iš 1,5 L ląstelių kultūros supernatanto išgryninta 6,2 mg aktyvaus baltymo (Suzuki & Shima, 1989).

1.3.5. *Pichia anomala* WC 65 išskiriamo toksino savybės ir gryninimas

Mielės *Pichia anomala* WC 65 išskiria chromosominėje DNR koduojamą toksiną. Toksinas yra stabilus pH intervale 2,0 – 5,0. Izoelektrinio fokusavimo metu gautas baltymo pI = 5,0. Toksino dydis 83,3 kDa. Toksinas veikia jungdamasis prie ląstelės sienelės receptorių β -1,6-gliukanų, o tikslus žudymo mechanizmas nėra žinomas (Sawant *et al.*, 1989).

Pichia anomala toksino gryninimui pritaikyti anijonų mainų chromatografijos ir gelfiltracijos metodai (5 pav.). Prieš chromatografinį gryninimą ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir sukonzentruotas 50 kartų su Millipore PTGC ultrafiltravimo sistema. Toksino koncentratas precipituojamas etanoliu, o susidariusios nuosėdos ištirpintos 20 mM piperazino buferiniame tirpale (pH 5,0).



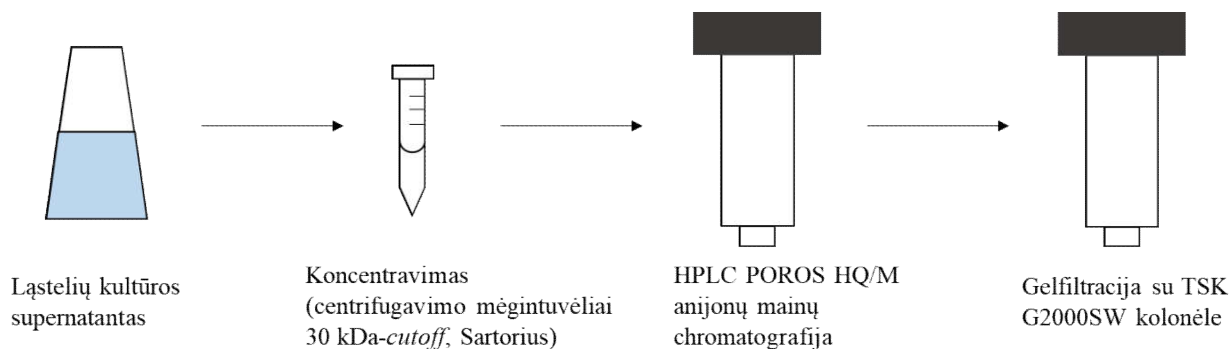
5 pav. *Pichia anomala* WC 65 išskiriamo toksino gryninimo schema (pagal Sawant *et al.*, 1989)

Prieš gryninimo eksperimentus, baltymo aminorūgščių seka ir jo pI nebuvo žinomi, todėl eksperimento sąlygos buvo parinktos remiantis baltymo stabilumu. Naudojama paruošta FPLC Mono Q HR 10/10 anijonito kolonėlė, kuriai būdinga didelė skiriamoji geba. Kolonėlė nulygsvarinta 0,1 M citratinio-fosfatiniu buferiniu tirpalu, kurio pH 4,6, optimalus kolonėlės veikimui ir tinkantis baltymo stabilumui (pH 2,0 – 5,0). Gryninimo metu taikytas linijinis NaCl gradientas nuo 0 iki 1 M koncentracijos. Atrinktos aktyvumą turinčios frakcijos sujungtos ir toksinas precipituojamas etanoliu. Nuosėdos ištirpintos 500 μ L 0,1 M citratiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 4,6). Siekiant atsikratyti likusių priemaišų atliktas antras gryninimo žingsnis – Superose 12 gelfiltracija. Iš 10 L ląstelių kultūros supernatanto išgryninta 0,36 mg baltymo. Platus toksino aktyvumo spektras prieš įvairius mielių *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia anomala* kamienus bei prieš *Candida albicans* patogenines mieles siūlo galimą toksino panaudojimą chemoterapijoje (Sawant *et al.*, 1989).

1.3.6. *Pichia anomala* išskiriamo K5 toksino savybės ir gryninimas

Pichia anomala NCYC 434 mielių išskiriamas K5 toksinas – 49 kDa dydžio baltymas. Toksinas aktyvus pH 3 – 5,5 ribose, žemesnėje nei 37 °C temperatūroje. Izoelektrinio fokusavimo metu įvertintas baltymo pI = 3,7. Toksinas jungiasi prie ląstelės sienelės β -1,3-gliukanų. Prisijungęs prie receptorių, toksinas pasižymi β -1,3-egzoglikanazės aktyvumu – hidrolizuoja ląstelės sienelės komponentus. Ląstelei praradus vientisumą, ji žūsta. Stebimas toksino aktyvumo padidėjimas pridėjus divalentių metalo jonų (Izgū & Altibay, 2004).

K5 toksinas išgrynintas dviejų žingsnių chromatografijų metu (6 pav.). Prieš chromatografinį gryninimą *Pichia anomala* NCYC 43 ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir 50 kartų sukonzentruotas naudojant centrifugavimo mėgintuvėlius (pralaidumas nuo 30 kDa) (Izgū & Altibay, 2004).



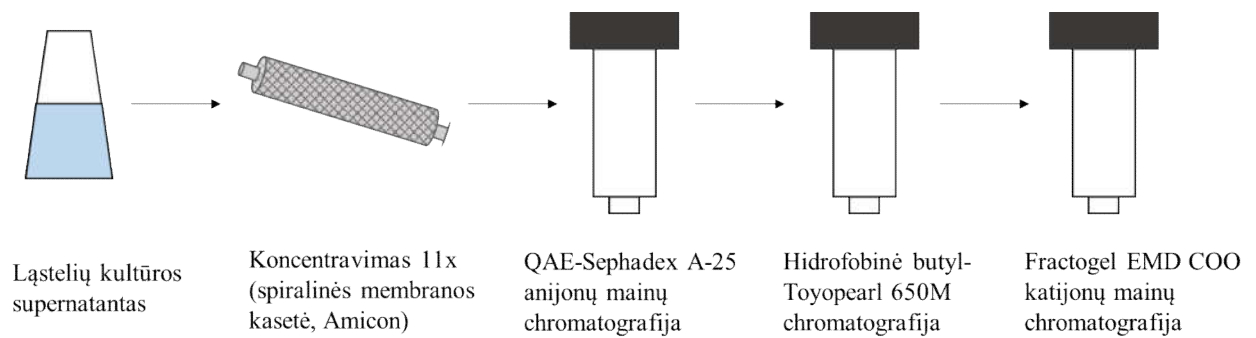
6 pav. K5 toksino gryninimo schema (pagal Izgü & Altinbay, 2004)

Vykdoma anijonų mainų chromatografija su paruošta HPLC POROS HQ/M kolonėle, nulygsvarinta 30 mM N-metil piperazino-HCl buferiniu tirpalu. Gryninimo metu buferinio tirpalo pH 4,8, tinkamas toksino aktyvumui (pH 3,0 – 5,5) ir kolonėlės veikimui. Baltymas eliuojamas taikant linijinį NaCl gradientą nuo 0 iki 500 mM. Aktyvumą turinčios frakcijos sujungtos, buferinis tirpalas pakeistas į 100 mM citratinį-fosfatinį buferinį tirpalą (pH 4,5), ultrafiltravimo metu (pralaidumas nuo 5 kDa). Antrame gryninimo etape, vykdoma gelfiltracija su TSK G2000SW kolonėle, nulygsvarinta 100 mM citratinio-fosfatiniu buferiniu tirpalu, turinčiu 100 mM Na₂SO₄. Toksinas eliuojamas tuo pačiu buferiniu tirpalu. Aktyvumą turinčios frakcijos sujungtos, o buferinis tirpalas pakeičiamas į 20 % glicerolį saugojimui tolimesniems tyrimams. Iš 10 L ląstelių kultūros gauta 6 mg aktyvaus baltymo (Izgü & Altinbay, 2004). K5 toksinas pasižymi plačiu aktyvumo spektru prieš įvairius grybus ir ląsteles, kurių struktūroje yra β-1,3-gliukanų: *Candida albicans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus*. Šią savybę siūloma panaudoti aplinkos ir pramonės biotechnologijų srityse, taip pat kaip priešgrybelinį vaistą (Kagiyama, Aiba, Kadowaki & Mogi, 1988; Walker *et al.*, 1995; Yap, de Barros Lopes, Langridge & Henschke, 2000).

1.3.7. *Schwanniomyces occidentalis* išskiriamo toksino savybės ir gryninimas

2000 metais išgrynintas *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 44252 toksinas. Chromosomoje koduojamas mikocinas sudarytas iš dviejų 7,4 ir 4,9 kDa dydžio subvienetų. Baltymas stabilus pH 3,8 – 5,0 reikšmėse. Didžiausiu aktyvumu pasižymi pH 4,2 – 4,8, 20 – 30 °C temperatūroje. Teigiama, jog *S. occidentalis* toksinas jungiasi prie jautrių mielių ląstelių sienelių manoproteinų. Toksinas pažeidžia plazminę membraną, pakeisdamas jos pralaidumą ir sukeldamas citoplazmos komponentų pratekėjimą (Chen *et al.* 2000).

Prieš gryninint baltymą, ląstelių kultūros supernatantas sukonzentruotas 11 kartų su Amicon spiralinės membranos kasete (7 pav.).



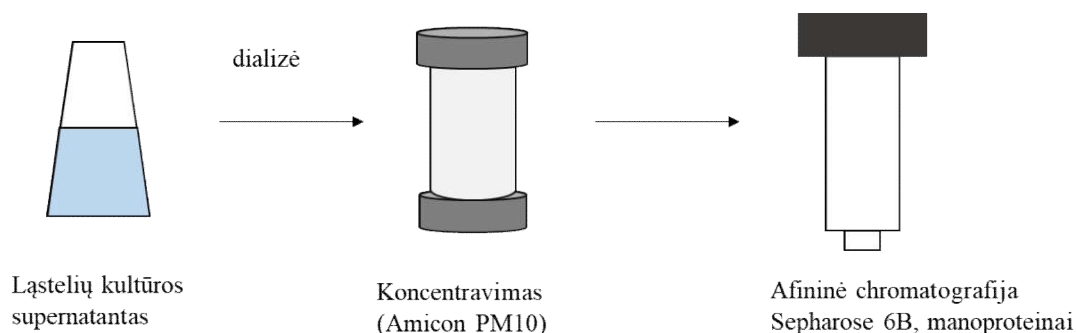
7 pav. *S. occidentalis* ATCC 44252 toksino gryninimo schema (pagal Chen *et al.*, 2000)

Pirmam toksino gryninimo žingsniui mokslininkai panaudojo anijonitą QAE-Sephadex A-25. Kolonėlė prieš tai nulygsvarinta 20 mM citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu. Parenkamas buferinio tirpalo pH 4,4, kuriam esant toksinas pasižymi didžiausiu aktyvumu. Prie QAE-Sephadex A-25 sorbento toksinas neprisikabino, todėl per koloną praėjusios, aktyvumą turėjusios frakcijos, surinktos ir toliau grynintos hidrofobinės chromatografijos metu. Naudojama butyl-Toyopearl 650 M kolonėlė, nulygsvarinta 20 mM citratiniu-fosfatinu buferiniu tirpalu (pH 4,4) turinčiu 0,7 M amonio sulfato. Siekiant atsikratyti likusių priemaišų, vykdytas trečias gryninimo etapas su katijonitu Fractogel EMD COO2 650, pH nekeičiamas. Toksinas eliuojamas su 3 M NaCl. Iš 10 L ląstelių kultūros supernatanto gauta 1,5 mg baltymo. Toksinas gali būti panaudojamas pramoninėje fermentacijoje siekiant išvengti užsikrėtimo laukinėmis mielėmis (Chen *et al.*, 2000).

1.3.8. *Zygosaccharomyces bailii* išskiriamo toksino Zigocino savybės ir gryninimas

Osmotolerantinės mielės *Zygosaccharomyces bailii* išskiria monomerinį toksiną – Zigociną. Dvigrandėje RNR koduojamas 239 aminorūgščių preprotoksinas subrendęs sekretuojamas į išorę kaip aktyvus 10,4 kDa dydžio baltymas (Weiler *et al.*, 2002). Didžiausias toksino aktyvumas stebimas pH 4,0, 20 °C temperatūroje (Weiler & Schmitt, 2003). Zigocinas žudo jautrias ląsteles dviem etapais. Pirmame etape Zigocinas jungiasi prie ląstelės sienelės manoproteinų. Antrame etape toksinas įsiterpia į plazminę membraną, pakeičia jos pralaidumą sutrikdydamas transmembraninį gradientą (Schmitt & Breinig, 2006).

2002 metais aprašytas efektyvus vieno žingsnio gryninimo metodas, pasinaudojant biospecifine sąveika tarp baltymo ir jo receptorių – manoproteinų (8 pav.). Mokslininkai išskyrė Zigocino receptorių iš mielių ląstelių frakcionavimo su cetavlonu (angl. *cetyltrimethylammonium bromide*) metu ir prijungė juos prie Sepharose 6B sorbento (Weiler *et al.*, 2002).



8 pav. Zigocino gryninimo schema (pagal Weiler *et al.*, 2002)

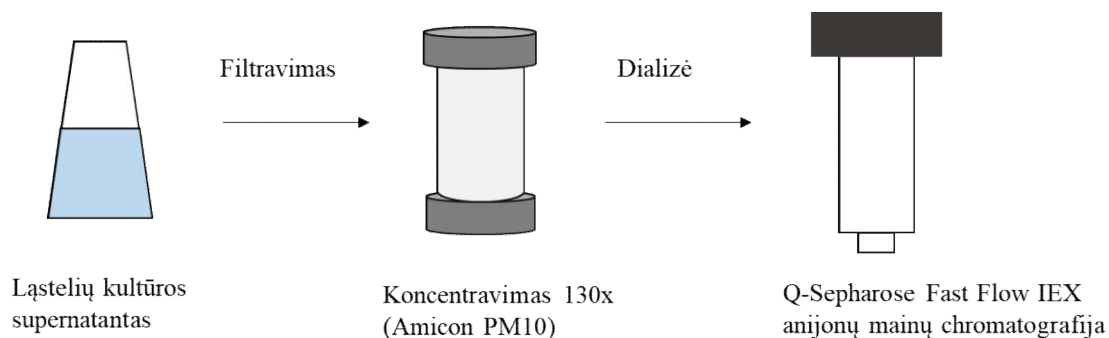
Prieš chromatografinį gryninimą ląstelių kultūros supernatantas sukonzentruotas su Amicon PM10 ultrafiltravimo sistema ir dializuotas 10 mM citratiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale. Afininės chromatografijos metu buferinio tirpalo pH 4,0, kuriam esant pasireiškia didžiausias toksino aktyvumas. Toksinas eliuojamas su 1 M NaCl. Zigocinas sėkmingai išgrynintas vieno žingsnio chromatografijos metu.

Dėl plataus aktyvumo spektro prieš įvairias žmogui kenksmingas ir fitopatogenines mieles, išgrynintas baltymas gali būti pritaikytas *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Sporothrix schenckii* sukeltų infekcijų gydymui (Weiler *et al.*, 2002).

1.3.9. *Kluyveromyces phaffii* išskiriamo Kpkt toksino savybės ir gryninimas

Kluyveromyces phaffii chromosomoje koduojamas 33 kDa dydžio baltymas – Kpkt toksinas. Mikocinas stabilus pH 3 – 5, < 40 °C temperatūroje. Atsižvelgiant į Kpkt toksino panašumą su *S. cerevisiae* β -1,3-gliukanaze bei *Candida albicans* β -1,3-transferaze, manoma, kad toksinas veikia jautrias ląsteles prisijungdamas prie sienelės receptorių β -1,6/ β -1,3-gliukanų ir suardydamas jų sienelę (Comitini *et al.*, 2004).

Toksinas išgrynintas vieno žingsnio chromatografinio gryninimo metu (9 pav.).



9 pav. Kpkt toksino gryninimo schema (pagal Comitini *et al.*, 2004)

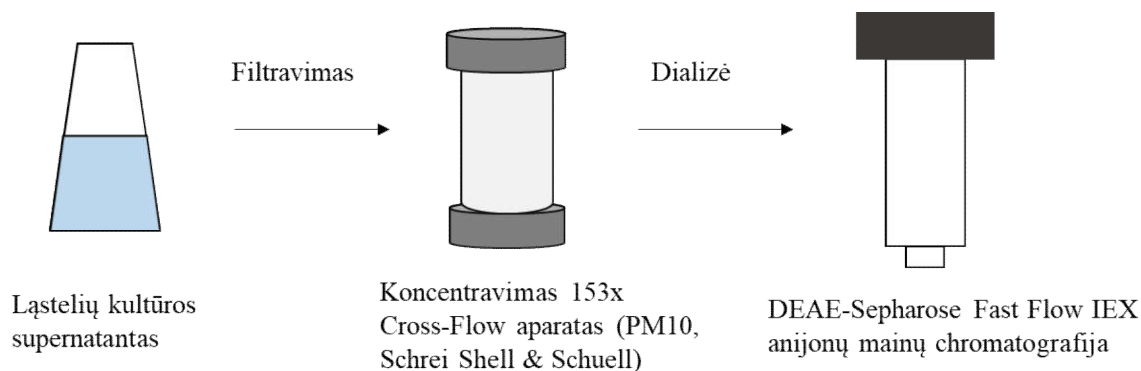
Ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir sukonzentruotas 130 kartų su Amicon PM10 ultrafiltravimo sistema. Toksinas dializuotas 10 mM citratiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 4,5. Baltymas grynintas anijonų mainų chromatografijos metu su Q-Sepharose Fast Flow IEX kolonėle, nulygsvarinta tuo pačiu buferiniu tirpalu. Buferinio tirpalo pH 4,5 optimalus

kolonėlės veikimui ir baltymo stabilumui. Toksino eliucijai pritaikytas žingsninis NaCl gradientas (0, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500 mM). Toksinas eliuojasi ties 125 mM NaCl koncentracija. Iš 18 L ląstelių kultūros supernatanto išgryninta 0,06 mg baltymo. Kadangi KpKt toksinas aktyvus prieš vyną gadinančias mieles, gali būti panaudojamas nepageidaujamų mikroorganizmų kontrolei vyno gamyboje. Mokslininkai išgrynino aktyvų toksiną ir nustatė jo molekulinę masę (33 kDa), glikozilinimą bei aktyvumą prieš laminariną ir gliukaną (Comitini *et al.*, 2004).

1.3.10. *Kluyveromyces wickerhamii* išskiriamo Kwkt toksino savybės ir gryninimas

Chromosomoje koduojamas, *Kluyveromyces wickerhamii* išskiriamas mikocinas – 72 kDa dydžio baltymas, stabilus pH 3,8 – 4,6. Didžiausiu aktyvumu toksinas pasižymi pH 4,4 ir 20 °C temperatūroje (Comitini & Ciani, 2011). Nėra žinoma, kaip toksinas veikia jautrias ląsteles, tačiau remiantis tyrimais su *B. bruxellensis* D46 mielėmis, manoma, jog jas nužudo blokuodamas ląstelės ciklą (Oro, Ciani, Bizzaro & Comitini, 2016).

Prieš gryninimą ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir sukonzentruotas 153 kartus naudojant Cross-Flow aparatą (PM10, Schrei Shell & Schuell). Toksinas dializuotas į 10 mM citratinį-fosfatinį buferinį tirpalą (pH 4,4) (10 pav.) (Comitini & Ciani, 2011).



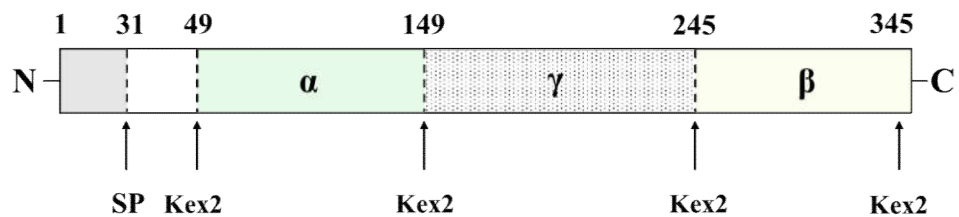
10 pav. Kwkt toksino gryninimo schema (pagal Comitini & Ciani, 2011)

Toksinas grynintas naudojant anijonito DEAE-Sepharose Fast Flow IEX kolonėlę, nulygsvarintą 10 mM citratinio-fosfatinio buferiniu tirpalu. Eksperimento metu buferinio tirpalo pH 4,4, kuriam eant pasireiškia didžiausias toksino aktyvumas. Baltymo eliucijai pritaikytas žingsninis NaCl gradientas (0, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300 mM). Toksinas eliuojasi ties 75 mM NaCl koncentracija. Iš 10 L ląstelių kultūros supernatanto gauta 2,86 mg baltymo, kurio dydis nustatytas elektroforetiškai (72 kDa). Išgrynintas toksinas panaudotas tolimesniems veikimo mechanizmų tyrimams (Comitini & Ciani, 2011). Vynuogėse augančių mielių *Kluyveromyces wickerhamii* toksinas pasižymi toksiškumu *Brettanomyces/Dekkera* mielėms, kurios yra nepageidaujamos vyno gamyboje, nes sukelia drumstumą, nemalonų kvapą ir padidina

vyno rūgštingumą. Išgrynintas Kwkt toksinas gali būti panaudotas nepageidaujamiems mikroorganizmams sustabdyti vyno gamyboje (Comitini *et al.*, 2004).

1.3.11. *Saccharomyces cerevisiae* išskiriamo K28 toksino savybės ir gryninimas

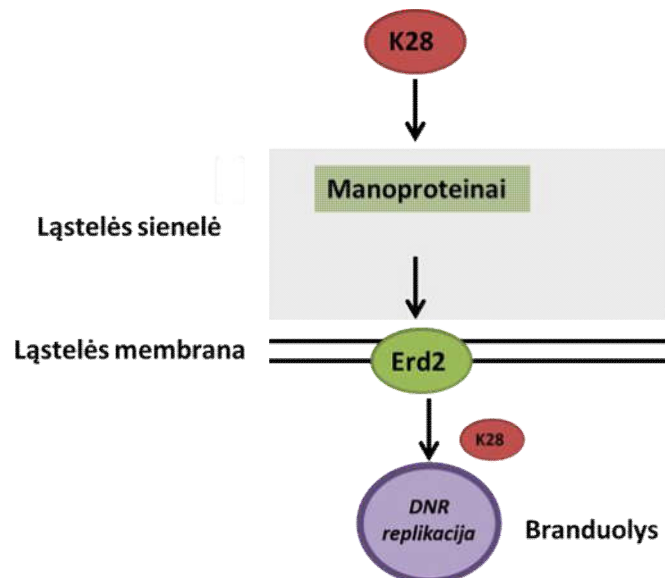
Saccharomyces cerevisiae kamieno išskiriamas K28 toksinas koduojamas virusinės kilmės dvigrandinėje RNR. Iš pradžių batymas yra sintetinamas kaip 345 aminorūgščių preprotoksinas (11 pav.), kuris subręsta sekrecijos kelyje ir yra išskiriamas kaip funkcionalus baltymas (Gier, Schmitt & Breinig, 2017; Meinhardt & Klassen, 2009).



11 pav. K28 preprotoksino struktūra (pagal Santos *et al.*, 2015)

Brendimo metu endoplazminiame tinkle pašalinama signalinė seka ir pretoksinas pernešamas į Goldžio aparatą tolesniam brendimui. Pašalinus γ segmentą ir likusią galinę N dalį gaunamas aktyvus toksinas (Santos *et al.*, 2015). Subrendusį mikociną sudaro α (11 kDa) ir β (10 kDa) subvienetai, kovalentiškai sujungti viena disulfidine jungtimi (Meinhardt & Klassen, 2009; Shmitt & Tipper, 1995).

K28 toksinas veikia blokuodamas DNR replikaciją (12 pav.) (Gier *et al.*, 2017).



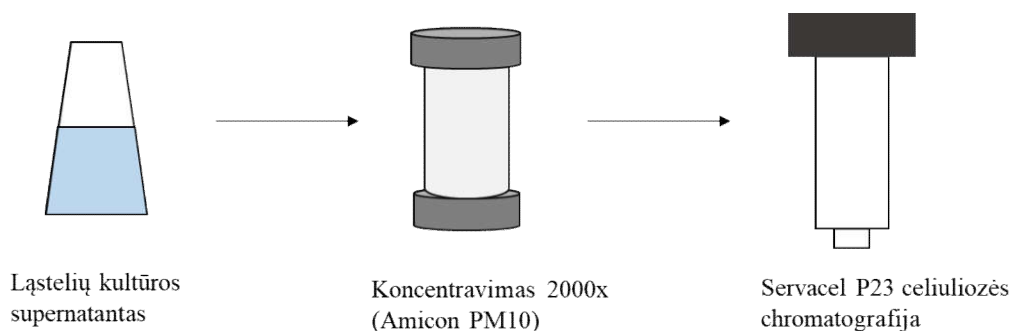
12 pav. K28 toksino veikimo mechanizmas (pagal Schaffrath *et al.*, 2018)

Mikocino veikimą sudaro du etapai. Pirmiausia, toksinas prisijungia prie ląstelės sienelės α -1,3-manoproteinų, tuomet rišasi prie plazminės membranos receptoriaus Erd2. Tuomet kompleksas yra monoubikvitilinas ir į ląstelę patenka endocitozės būdu (Schitt & Breinig, 2006). Ląstelės viduje susidaro pūslelės, vyksta transportavimas atgaliniu sekrecijos keliu per

Goldžio kompleksą ir endoplazminį tinklą. Toksinas keliauja į branduolį, blokuoja DNR sintezę (Gier *et al.*, 2017). Kol kas, K28 toksinas yra vienintelis žinomas toksinas, patenkantis į ląstelę endocitozės būdu, atgaliniu sekrecijos keliu (Schaffrath *et al.*, 2018). Tai stabilus glikoproteinas, kurio optimalus veikimas stebimas pH 5,8 ir iki 42 °C temperatūroje, baltymo pI = 4,37 (Schmitt & Tipper, 1995).

Mokslinėje literatūroje aprašyti keli K28 toksino gryninimo metodai. Pirmą kartą toksinas grynintas taikant gelfiltracijos metodą. Prieš chromatografinį gryninimą toksinas išsodintas su amonio sulfatu, gautos nuosėdos ištirpintos citratiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 4,8) ir mėginys dializuotas. Toksinas grynintas Sephadex G-150 gelfiltracijos metu. Eliucija vykdyta citratiniu-fosfatiniu buferiniu tirpalu, turinčiu 0,008 M Mg₂SO₄, (pH 4,8). Tačiau baltymas stipriai sorbavosi ant Sephadex sorbento ir toksino išgryninti nepavyko (Woods & Bevan, 1968).

Kitas bandymas išgryninti K28 toksiną, buvo sėkmingas. Mokslininkai išgryninino K28 toksiną pritaikę jonų mainų chromatografiją (13 pav).



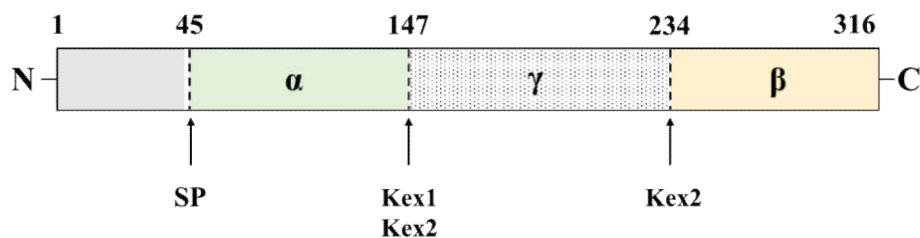
13 pav. K28 toksino gryninimo schema (pagal Pfeiffer & Radler, 1982)

Prieš chromatografinį gryninimą ląstelių kultūros supernatantas nufiltruotas ir sukonzentruotas 2000 kartų su Amicon PM10 ultrafiltravimo sistema. Chromatografiniam gryninimui pasirinktas katjonitas P23 celiuliozės sorbentas (Servacel). Siekiant baltymo prisijungimo prie katjonito, eksperimento metu naudojamas pH 3,5. Toksinas eliuavosi pritaikius linijinį KCl koncentracijos gradientą 0 – 2 M. Iš 20 L ląstelių kultūros supernatanto gauta 6,5 mg aktyvaus baltymo, kuris panaudotas sąveikos su receptoriais tyrimams. Sukurta veiksminga *S. cerevisiae* K28 toksino gryninimo schema, kurioje išvengiama šiurkščių sąlygų, įvairių detergentų panaudojimo (Pfeiffer & Radler, 1982).

1.3.12. *Saccharomyces cerevisiae* išskiriamo K1 toksino savybės ir gryninimas

Kitas *S. cerevisiae* išskiriamas toksinas K1 – dimeras, sudarytas iš dviejų subvienetų (α 9,5 kDa ir β 9,0 kDa), sujungtų trimis disulfidiniais tilteliais (Meinhardt & Klassen, 2009). Baltymo pI = 4,78. Toksinas aktyvus 4,2 – 4,7 pH intervale, o stabilumą praranda pH reikšmei esant

didesnei nei 5. Toksinas inaktyvuojasi aplinkos temperatūrai esant virš 30 °C. K1 toksino pirmtakas – 316 aminorūgščių preprotoksinas) (14 pav.) (Santos, *et al.*, 2015).

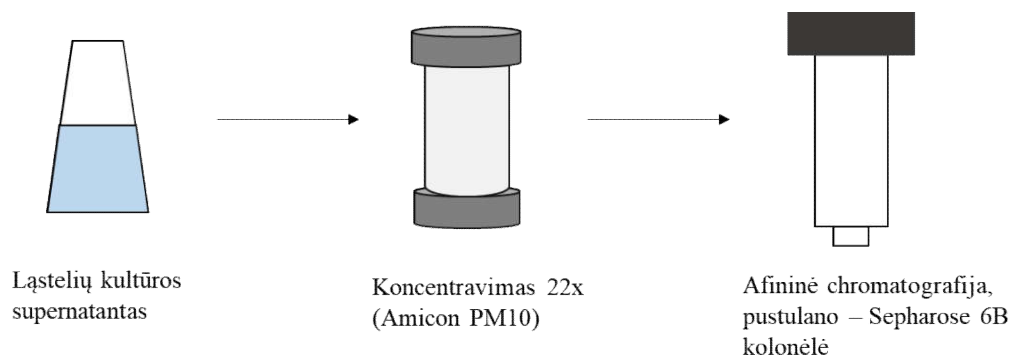


14 pav. K1 preprotoksino struktūra (pagal Santos *et al.*, 2015)

Brendimo metu susintetintas K1 preprotoksinas nukreipiamas į endoplazminį tinklą, kuriame peptidazė pašalina signalinį peptidą. Goldžio aparate peptidazės pašalina likusį N – galinį segmentą ir sukarpo toksiną į α, β ir γ segmentus. Pašalinus γ regioną, gaunamas subrendęs α/β heterodimerinis toksinas (Santos *et al.*, 2015).

Literatūroje siūlomas dviejų žingsnių K1 toksino veikimo mechanizmas. Pirmiausia, toksinas prisiriša prie pirminių receptorių β-1,6-gliukanų. Tuomet aktyvios pernašos metu toksinas pereina per plazminę membraną, kur sąveikauja su antriniu receptoriu Krel. Dėl toksino susirišimo su Krel receptoriu, pasikeičia membranos laidumas ir tai sukelia ląstelių mirtį. Manoma, jog toksinas membranoje suformuoja jonų kanalus arba aktyvuoja joje jau esančius jonų kanalus (Gier *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2015; Schaffrath *et al.*, 2018).

Mokslininkai sukūrė vieno žingsnio chromatografinio gryninimo metodą K1 toksinui išgryninti, remiantis biospecifine baltymo sąveika su receptoriais (15 pav.) (Hutchins & Bussey, 1983).



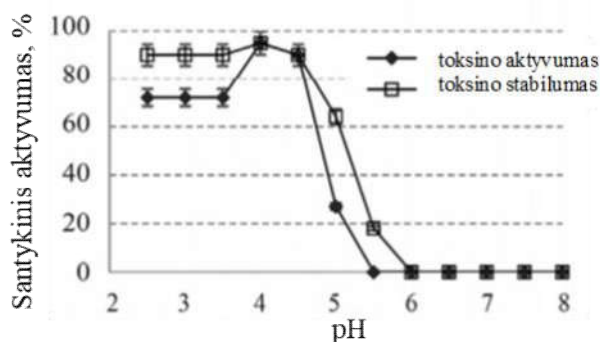
15 pav. K1 toksino gryninimo schema (pagal Hutchins & Bussey, 1983)

Ląstelių supernatantas nufiltruotas ir 22 kartus sukonzentruotas iki 45 mL naudojant Amicon PM10 ultrafiltravimo sistemą. Toksinas išgrynintas afininės chromatografijos metu naudojant Sepharose 6B sorbentą su prijungtu pustulanu (β-1,6-gliukanu). Kolonėlė prieš gryninimą nulygsvarinta 0,1 M natrio acetato buferiniu tirpalu su 15 % glicerolio. Buferinio tirpalo pH 4,7 tinkamas toksino aktyvumo pasireiškimui. Toksinas eliuavosi pakeitus buferinį tirpalą į 0,1 M Tris buferinį tirpalą su 15 % glicerolio (pH 7,5). Frakcijos, turinčios didžiausią

aktyvumą, surinktos, dializuotos ir sukonzentruotos elektroforetinei analizei. Gautas elektroforetiškai homogeninis baltymas (molekulinis svoris 11 kDa). Darbo metu buvo patvirtinta, kad β -1,6-gliukanai yra toksino receptoriai mielių ląstelių sienelėje (Hutchins & Bussey, 1983).

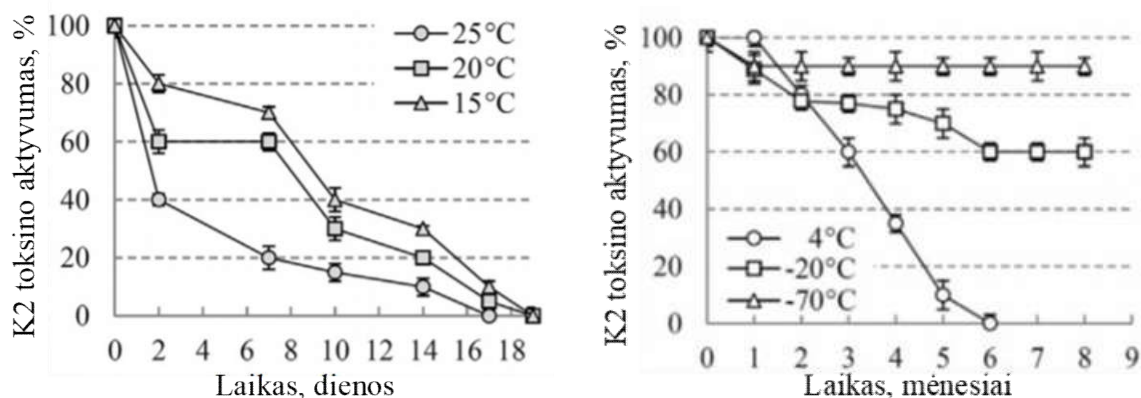
1.3.13. *Saccharomyces cerevisiae* išskiriamo K2 toksino struktūra ir gryninimas

Vyno mielių *S. cerevisiae* sintetinamas K2 toksinas pasižymi dideliu aktyvumu žemuose pH (Esser & Lemke, 1995). Toksino dydis – 38,7 kDa, jį sudaro α (18,9 kDa) ir β (15,4 kDa) subvienetai. Baltymo teorinis pI = 4,7. K2 toksino optimalus veikimo pH 4,0 (16 pav.) (Esser & Lemke, 1995; Lukša, Serva & Servienė, 2015; Meinhardt & Klassen, 2009).



16 pav. pH įtaka toksino funkcionalumui (pagal Lukša *et al.*, 2015)

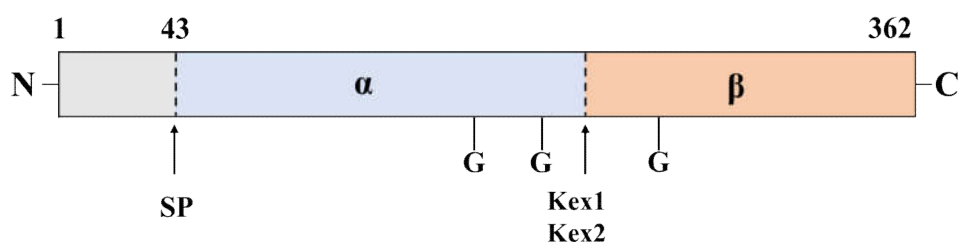
K2 ypač aktyvus rūgštiniame pH (2,5 – 4,5), o inaktyvuojasi šarminesnėje nei pH 5,5 aplinkoje. Didžiausias toksino aktyvumas stebimas aplinkos temperatūrai esant 20 – 25 °C (17 pav.) (Lukša *et al.*, 2015).



17 pav. Temperatūros įtaka K2 toksino aktyvumui (pagal Lukša *et al.*, 2015)

Toksinas, laikomas nuo 4 iki -70 °C temperatūroje, nepraranda aktyvumo mėnesiais, o laikomas 20 °C temperatūroje, po 10 dienų praranda daugiau nei 50 % aktyvumo (Lukša *et al.*, 2015).

M2 viruso dgRNR, koduojančios K2 toksiną, pirminis produktas yra 362 aminorūgščių preprotoksinas (18 pav.).

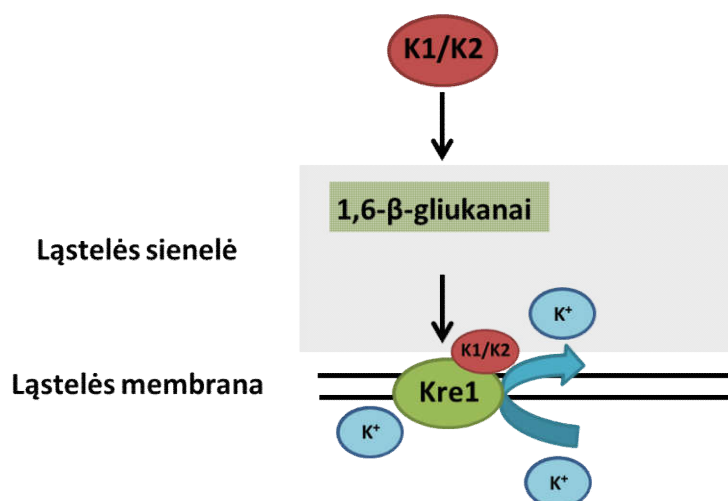


18 pav. K2 preprotoksino struktūra (SP – signalinis peptidas, G – glikozilinimo vietos) (pagal Dignard *et al.*, 1991)

Preprotoksinui bręstant, pašalinama N-galinė signalinė seka peptidazei kerpanč ties Ala43 (Meškauskas & Čitavičius, 1992). Aktyvaus toksino išskyrimas priklauso nuo Kex1 ir Kex2 proteazių, kurios kerpa ties Arg221, padalindamos baltymą į α (172 aminorūgščių) ir β (140 aminorūgščių) subvienetus (Dignard, Whiteway, Germain, Tessier & Thomas, 1991; Magliani, Conti, Gerloni, Bertolotti & Polonelli, 1997). Įvardinama ir kita galima Kex2 proteazės kirpimo vieta – Lys267Arg268, tačiau tyrimais įrodyta, jog šios sekos pašalinimas neturi įtakos toksino aktyvumo pasireiškimui (Dignard *et al.*, 1991). Nustatyta, kad pašalinus iš ląstelės *KEX1* geną, 10 kartų sumažėja sekretuojamo toksino aktyvumas (Servienė, Čeponytė, Lebionka & Melvydas, 2007).

K2 toksinas turi tris galimas glikozilinimo vietas: dvi α srityje (177, 214 padėtyse) ir viena β srityje (261 padėtyje) (Dignard *et al.*, 1991). Remiantis baltymo aminorūgščių seka, nustatyta, jog N-galinė baltymo dalis (α subvieneto) yra hidrofobinė. Šiame regione palankiausia signalinio peptido skilimo vieta yra α subvienete, tarp dviejų alaninų, 43 ir 44 pozicijose (von Heijne, 1986). Konstruktuose, kuriuose netoli signalinio peptido (tarp 38 ir 39 aminorūgščių) įterptos dvi aminorūgštys (fenilalaninas ir prolinas), buvo prarastas imunitetas, tačiau išlaikytas aktyvumas. Šis įvykis lemia “savižudybės” fenotipą – kai žemose pH reikšmėse, tokie mielių konstruktai išskiria aktyvų toksiną, kuriam nėra atsparūs, ir dėl to yra nužudomi savo paties išskiriamo baltymo (Dignard *et al.*, 1991).

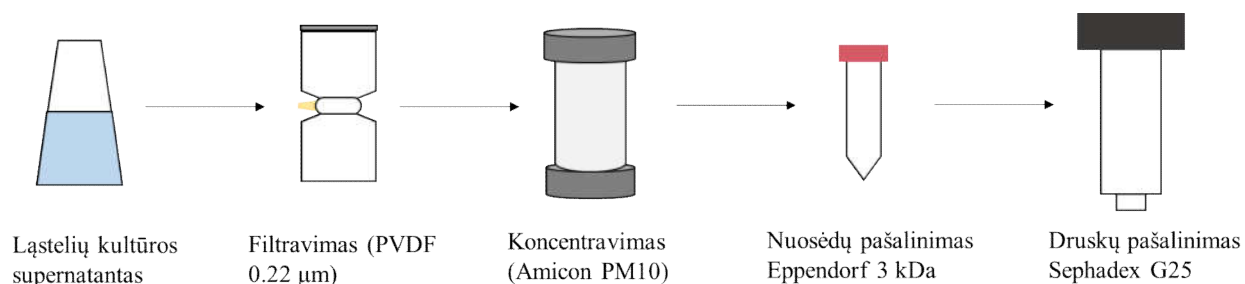
K2 toksino veikimas nėra tiksliai žinomas, tačiau remiantis panašia K1 ir K2 toksinų struktūrine domenų organizacija, manoma, kad žudymo mechanizmas yra panašus (19 pav.) (Novotná, Flegelova & Janderovala, 2004).



19 pav. K1/K2 toksinų veikimo mechanizmas (pagal Lukša *et al.*, 2015)

Analogiškai K1 toksinui, K2 paveikia ląstelę prisijungdamas prie pirminių sienelės paviršiaus receptorių β -1,6-gliukanų ir prie antrinių – membranos Kre1 baltymų. Tikėtina, kad K2 baltymas keičia ląstelės – taikinio membranos laidumą. Nustatyta, jog prie vienos mielių ląstelės prisijungia apie 460 K2 molekulių, tuo tarpų K1 prisijungia 555 (Lukša *et al.*, 2015).

Dvigrandėje RNR koduojamas *S. cerevisiae* išskiriamas K2 toksinas grynintas keliais etapais (20 pav.) (Lebionka, Servienė & Melvydas, 2002).



20 pav. K2 toksino gryninimo schema (pagal Lebionka *et al.*, 2002)

Siekiant geriausio toksino išskyrimo, *S. cerevisiae* Rom K-100 mielės augintos mineralinėje augimo terpėje (pH 4,0). Ląstelių supernatantas nufiltruotas per Amicon PM-10 membraną ir sukonzentruotas naudojant Amicon PM10 ultrafiltravimo sistemą. Priemaišos ir druskos pašalintos centrifuguojant koncentratą Ependorf koncentravimo mėgintuvėliuose, supernatanto nudruskinamui pasirinkta Sephadex G25 kolonėlė. Iš trijų litrų ląstelių kultūros supernatanto gauta 1 μg baltymo. Tačiau šiuo metodu gautas aktyvus toksinas su priemaišomis, kurio kiekiai yra per maži tolimesniems toksino funkciniais tyrimams (Lebionka *et al.*, 2002), todėl yra svarbu sukurti efektyvią gryninimo schemą.

Apibendrinus mokslinėje literatūroje aprašytus įvairių toksinų gryninimo eksperimentus, norint išgryninti aktyvų baltymą susiduriama su 2 pagrindinėmis problemomis. Toksinų aktyvumas pasireiškia ribotame pH intervale – tai apsunkina jonitų ir chromatografinio

gryninimo sąlygų pasirinkimą. Kita problema – gaunami nedideli toksinų kiekiai. Pavyzdžiui, išgryninta 6,5 mg K28 toksino iš 20 L ląstelių kultūros supernatanto (Pfeiffer & Radler, 1982), *Williopsis saturnus* mielių išskiriamo toksino išgryninta 0,5 mg iš 5 L terpės (Wang *et al.*, 2012), *Pichia anomala* WC 65 išskiriamo toksino išgryninta 0,36 mg iš 10 L ląstelių kultūros supernatanto, Kpkt toksino išgryninta 0,06 mg iš 18 L ląstelių kultūros supernatanto (Comitini *et al.*, 2004) ir kt.

Mokslinėje literatūroje nėra aprašyto veiksmingo K2 toksino gryninimo būdo. K2 baltymo gryninimo eksperimentuose gauti per maži aktyvaus produkto kiekiai (1 µg iš 3 L terpės). Be to, po gryninimo toksinas lieka su priemaisomis, kas apsunkina tolimesnius baltymo analizės etapus (Lebionka *et al.*, 2002).

Šiame darbe vykdomi toksino gryninimo optimizavimo darbai, siekiant parinkti geriausią gryninimo schemą aktyvaus ir švaraus baltymo gavimui, tinkamo panaudoti tolimesniuose struktūriniuose tyrimuose.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos, tirpalai, prietaisai

2.1.1. Medžiagos

2 lentelė. Darbe panaudotos medžiagos

Medžiaga	Gamintojas
Acto rūgštis, 99,8 %	Roth
Agaras	Merk
Agarozė	Serva
Akrilamidas	Roth
Amonio persulfatas (APS)	Fluka
Amonio sulfatas (NH ₄) ₂ SO ₄	Aeros Organics
Blue-Sepharose CL6B	GE Healthcare
Butyl-Sepharose	GE Healthcare
CM Sephadex C-50	Pharmacia
Chimotripsinogenas	Sigma
Citochromas C	Serva
Citrinos rūgštis	Chempur
ConCanavalin A Sepharose 4B	GE Healthcare
DEAE-Sepharose	GE Healthcare
Dikalio fosfatas (K ₂ HPO ₄)	Chempur
Druskos rūgštis, 37 %	Riedel-de-Haën
Etilenglikolis	Sigma
Glicerolis	Roth
Glicinas	Roth
Gliukozė	Merk
Jaučio serumo albuminas (BSA)	Sigma
Kalcio chloridas (CaCl ₂)	Roth
L-Histidinas	Roth
Mangano chloridas (MnCl ₂)	Sigma
Metileno mėlis	Bio-Rad
MgSO ₄ × 12H ₂ O	Aeros Organics
Mielų ekstraktas	Difco

2 lentelė. (tęsinys)

Medžiaga	Gamintojas
Molekuliniai baltymų standartai elektroforezei	ThermoFisher Scientific
N,N'-Metilen-bis-akrilamidas (BIS)	Serva
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	Chempur
Na ₂ S ₂ O ₃ × 5H ₂ O	Sigma
Natrio chloridas (NaCl)	Fluka
Natrio dodecilsulfatas (SDS)	Bio-Rad
Natrio šarmas (NaOH)	Lachema
Nizinas	Handary
Ovalbuminas	GE Healthcare
Peptonas	Bakto
Phenyl-Sepharose	GE Healthcare
Q-Sepharose	GE Healthcare
Sephadex G75	Pharmacia
SilverExpress elektroforezės dažymo rinkinys	ThermoFisher Scientific
SP-Sepharose	GE Healthcare
Tetrametilendiaminas (TEMED)	Fluka
Tricinas	Roth
Tris (hidroksimetil) aminometanas (TRIS)	Rieder-de-Haën

2.1.2. Terpės, tirpalai

MB terpė (pH 4,0): 0,5 % mielių ekstrakto, 4 % gliukozės, 0,5 % peptono, 1,05 % citrinos rūgšties, 3,53 % Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 0,003 % metileno mėlio, 2 % agarų. Terpės pH iki reikiamos vertės reguliuojama citrinos rūgšties arba natrio šarmo tirpalu (Naumova & Naumov, 1973).

YEPD terpė: 1 % mielių ekstrakto, 2 % peptono, 2 % gliukozės; į agarizuotą terpę pridedama 2 % agarų (Ausubel, 1999).

Mielių toksino išskyrimo terpė (SC), pH 4,0: 2 % gliukozės, 0,2 % K₂HPO₄, 0,1 % MgSO₄ × 12H₂O, 0,1 % (NH₄)₂SO₄, 1,29 % citrinos rūgšties, 2,76 % Na₂HPO₄ × 12 H₂O (Naumova & Naumov, 1973).

30 % akrilamidas + BIS: 29,2 g akrilamido, 0,8 g BIS (N,N'-metilen-bis-akrilamidas) ištirpinama dejonizuotame vandenyje ir praskiedžiama matavimo kolboje iki 100 mL.

1,5 M TRIS, pH 8,8: 18,17 g tris (hidroksimetil) aminometano (TRIS) ištirpinama 70 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 3x skiesta druskos rūgštimi iki 8,8. Praskiedžiama matavimo kolboje iki 100 mL.

0,5 M TRIS, pH 6,8: 6,06 g TRIS ištirpinama 70 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 3x skiesta druskos rūgštimi iki 6,8. Praskiedžiama matavimo kolboje iki 100 mL.

3 M TRIS, pH 8,45: 36,342 g TRIS ir 0,4 g SDS ištirpinami 70 mL distiliuoto vandens, pH privedamas iki 8,45 palaikant kambario temperatūrą, tūris privedamas iki 100 mL.

40 % 19:1 skiriamasis gelis: 38 g akrilamido, 2 g BIS ištirpinama 100 mL distiliuoto vandens.

40 % 29:1 skiriamasis gelis: 38,67 g akrilamido, 1,33 g BIS ištirpinama 100 mL distiliuoto vandens.

10 % SDS: 5,0 g natrio dodecilsulfato tirpinama 50 mL dejonizuoto vandens, laikoma kambario temperatūroje.

10 % APS: 0,1 g amonio persulfato (APS) ištirpinama 1 mL vandens.

40 % APS: 0,4 g amonio persulfato ištirpinama 1 mL vandens.

Tris-Glicino elektrodinis buferinis tirpalas, 5 kartus koncentruotas: 30 g TRIS, 144 g glicino ir 10 g natrio dodecilsulfato ištirpinama dejonizuotame vandenyje ir praskiedžiama iki 2 L. Laikoma šaldytuve. Tirpalo pH turi būti 8,3 – 8,6, tačiau koreguoti negalima. Prieš naudojimą tirpalas skiedžiamas 5x dejonizuotu vandeniu iki 500 mL.

Tris-Tricino elektrodinis buferinis tirpalas, 10 kartų koncentruotas: 24,23 g TRIS, 35,84 g tricino, 2 g SDS ištirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 200 mL. Elektroforezei imama 50 mL buferinio tirpalo ir skiedžiama iki 500 mL.

Pavyzdžio buferinis tirpalas Sample, 4 kartus koncentruotas: 0,8 g SDS ištirpinama 2,5 mL 1 M TRIS-HCl (pH 6,8) ir 4 mL glicerolio. Priedama 0,1 mL 0,5 % bromfenolio mėlio tirpalo (0,5 g /100 mL; 0,005 g į 1 mL vandens). Skiedžiama distiliuotu vandeniu iki 8 mL.

2.1.3. Mikroorganizmai

Saccharomyces cerevisiae α'1, *Saccharomyces cerevisiae* Klus, *Saccharomyces cerevisiae* K1, *Saccharomyces cerevisiae* K28, *Saccharomyces cerevisiae* K2, *Candida argentea*, *Candida boidinii*, *Candida californica*, *Candida oleophila*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania africana*, *Kazachstania aerobia*, *Kazachstania bulderii*, *Kazachstania servazzi*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia terricola*, *Saccharomyces paradoxus*, *Torulaspora delbrueckii*.

2.1.4. Prietaisai

3 lentelė. Darbe panaudoti prietaisai

Pavadinimas	Gamintojas
Analitinės svarstyklės „SBA 31“ (Max 220 g, d = 0,1 mg)	Scaltec
Automatinės pipetės	Eppendorf
Centrifuga „Beckman J2-21M/E“	Beckman
Centrifuga „Eppendorf“	Eppendorf
Centrifuga „Rotina 35R“	Hettich
Chromatografinė sistema ÄKTA prime plus	GE Healthcare
Chromatografinė kolonėlė (10 mm x 16 cm) su adapteriais	GE Healthcare
Chromatografinė kolonėlė (15 mm x 20 cm) su adapteriais	GE Healthcare
Chromatografinė kolonėlė (16 mm x 40 cm) su adapteriais	GE Healthcare
Dializės žarnelė (ZelluTrans, MWCO: 12,000-14,000)	Roth
Elektroforezės aparatas	Labtech
Elektroforezės srovės šaltinis	Amersham
Filtravimo sistema – vakuuminis filtras (Millipore, 0,22 µm)	Millipore
Koncentravimo mėgintuvėliai (3000 MWCD)	Millipore
Magnetinė maišyklė „MS 3000“	BIOSAN
Magnetinė maišyklė „REO Basic C“	IKA
Peristaltinis siurblys 120U/DV	Watson-Marlow
pH-metras	Mettler-Toledo
Svarstyklės „SPO 61“ (Max 3100 g, d = 0,1 g)	Scaltec
Šaldiklis	Snaigė
Šaldytuvas	Snaigė
Šaldymo spinta	Lab Line
Švirkštai „Hamilton“	Sigma
Ultrafiltravimo sistema Amicon PM-10	Millipore
Vienkartiniai švirkštai	Neomedic

2.2. Metodai

2.2.1. Spektrofotometrinis ląstelių tankio nustatymas

Milių ląstelių tankis matuojamas spektrofotometriškai ties 600 nm bangos ilgiu (0,1 OT₆₀₀ atitinka ~ 3 × 10⁶ ląst./mL) (Sherman, 2002).

2.2.2. Toksino išskyrimo terpės koncentravimas

K2 toksiną produkuojantis mielių *S. cerevisiae* kamienas užsėjamas į 1 L skystos toksino išskyrimo terpės (pH 4,0). Ląstelės inkubuojamos 4 paras 18 °C temperatūroje silpnai aeruojant (40 aps./min.). Ląstelės pašalinamos centrifuguojant 5000 aps./min. greičiu 10 min., supernatantas filtruojamas per vakuuminį filtrą (Millipore Express Plus, 0,22µm). Filtruotas toksinas koncentruojamas 20 kartų pritaikius Amicon PM-10 (Millipore) ultrafiltravimo sistemą ir iki panaudojimo laikomas 4 °C temperatūroje.

2.2.3. SP-Sepharose jonų mainų chromatografija

Jonų mainų chromatografija vykdoma naudojant „AKTA Prime Plus“ chromatografinę sistemą. SP-Sepharose kolonėlė (15 mm × 130 mm) lygsvarinama 10 kolonos tūrių 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2), 1,5 mL/min greičiu. Sukoncentruota toksino terpė skiedžiama 12 kartų tuo pačiu buferiniu tirpalu. Praskiestos terpės laidumas 2,00 mS/cm. Mėginys siurbiamas 1,5 mL/min greičiu. Neprisijungę prie kolonėlės junginiai nuplaunami lygsvarinimo buferiniu tirpalu. Toksino eliuavimui kolonėlė plaunama taikant NaCl linijinį gradientą nuo 0 iki 0,4 M 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale (pH 4,2) (plaunama 7 kolonos tūriais). Toksinas ir kitos mėginyje esančios medžiagos detektuojamos esant 280 nm bangos ilgiui. Surenkamos frakcijos, matuojamas aktyvumas.

2.2.4. Dializė

Po pirmo gryninimo etapo aktyvumą tuinčios frakcijos apjungiamos ir dializuojamas per ZelluTrans dializės žarnelę (pralaidumas 12,000 – 14,000 Da). Mėginys dializuojamas 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale (pH 4,2) per naktį, ant magnetinės maišyklės. Po dializės mėginys gryninamas antrame chromatografijos etape.

2.2.5. CM-Sephadex C-50 jonų mainų chromatografija

CM-Sephadex C-50 sorbentu užpildyta kolonėlė (10 mm × 120 mm) lygsvarinama 10 kolonos tūrių 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2). Pirmo gryninimo etapo metu gautas ir per naktį dializuotas mėginys siurbiamas 0,2 mL/min greičiu. Neprisijungę prie kolonėlės junginiai nuplaunami lygsvarinimo buferiniu tirpalu. Toksino eliuavimui kolonėlė plaunama taikant NaCl linijinį gradientą nuo 0 iki 0,3 M 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale (pH 4,2) (plaunama 4 kolonos tūriais). Toksinas ir kitos mėginyje esančios medžiagos detektuojamos esant 280 nm bangos ilgiui. Surenkamos frakcijos, matuojamas aktyvumas.

2.2.6. Sephadex G75 gelfiltracija

Gelfiltracija vykdoma naudojant junginius pagal molekulinę masę skirstantį Sephadex G75 sorbentą, kurio frakcionavimo ribos yra 3 000 – 80 000 Da. Sephadex G75 sorbentu užpildyta kolonėlė (16 mm × 340 mm) lygsvarinama 3 kolonos tūriais 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu su 0,1 M NaCl (pH 4,2) 0,2 mL/min greičiu.

Siekiant įvertinti analizuojamos medžiagos molekulinį dydį, gelfiltracinė kolonėlė kalibruojama su žinomos molekulinės masės baltymais: nizinu ($M = 3\,354$), citochromu c ($M = 12\,384$ Da), chimotripsinogenu ($M = 25\,000$ Da), karboanhidraze ($M = 29\,000$ Da), ovalbuminu ($M = 45\,000$), jaučio serumo albuminu ($M = 67\,000$ Da). Paruošiami baltymų tirpalai, kurių koncentracija 0,5 mg/mL. Į kilpą suleidžiama 250 µL mėginio ir jis susiurbiamas ant Sephadex G75 sorbento. Iš gautų smailių, kurios atitinka konkretaus baltymo eliacijos laiką, "Microsoft Excel" programa brėžiama kalibracinė kreivė, kur abscisių ašyje atidedamos sulaikymo trukmės minutėmis, o ordinačių ašyje – baltymų molekulinių masių dešimtainiai logaritmai. Gaunama tiesės lygtis, kuri vėliau panaudojama analizuojamos medžiagos molekulinę masę apskaičiuoti.

Surinkti trys dviem žingsniais (SP-Sepharose ir CM-Sephadex) išgryninti mėginiai koncentruojami iki 250 µL. Sukoncentruotas mėginys švirkštu suleidžiamas į 500 µL dydžio kilpą (angl. *sample loop*) per kurią susiurbiamas ant sorbento 0,2 mL/min greičiu. Kolonėlė plaunama lygsvarinimo buferiniu tirpalu. Junginiai detektuojami esant 280 nm bangos ilgiui, renkamos frakcijos, tikrinamas jų aktyvumas.

2.2.7. Baltymų elektroforezė

Po kiekvieno gryninimo etapo siekiant įvertinti mėginio grynumą bei molekulinę masę, atliekama baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis: Tris-Tricino elektroforezė (16 %) poliakrilamidiniame gelyje (žr. 4 lentelę) ir Tris-Glicino elektroforezė (15 %) poliakrilamido gelyje (žr. 5 lentelę).

4 lentelė. Tris-Tricino elektroforezės skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio paruošimas

Sudėtis	Skiriamasis gelis (16 %)	Koncentruojantis gelis (5 %)
Etilenglikolis	1,2 mL	-
3 M Tris-HCl buf. tirp., pH 8,45	1 mL	1 mL
40 % akrilamidas/bisakrilamidas	1,8 mL (19:1)	0,5 mL (29:1)
dH ₂ O	-	2,5 mL
40 % APS	4 µL	4 µL
TEMED	12 µL	16 µL
Galutinis tūris	~ 4 mL	~ 4 mL

Į paruoštą gelio formą pilamas skiriamasis gelis (16 %), ant viršaus užpilama vandens ir laukiama, kol gelis susipolimerizuos. Geliui sustingus, nupilamas vanduo ir užpilamas koncentruojantis gelis (5 %). Į dar nesustingusį koncentruojantį gelį įstatomos šukos – suformuojami šulinėliai. Viršutiniam geliui sustingus išimamos šukos ir šulinėliai praplaunami 10x skiestu Tris-Tricino elektroforezės buferiniu tirpalu. Gelio forma įstatoma į aparatą, formos ir aparato rezervuarai užpildomi elektroforezės buferiniu tirpalu. Į šulinėlius įnešami analizuojami mėginiai ir molekulinį svorių standartas. Elektroforezė vykdoma pastovia 20 mA srove, kol dažo frontas išeina iš gelio (~3,5 val.). Elektroforezei pasibaigus, išjungiamas srovės šaltinis, gelis išimamas iš formos. Prieš dažymą gelis praplaunamas distiliuotu vandeniu.

5 lentelė. Tris-Glicino elektroforezės skiriamojo ir koncentruojamojo gelio paruošimas

Sudėtis	Skiriamasis gelis (15 %)	Koncentruojantis gelis (4 %)
30 % akrilamido/BIS	5 mL	1,3 mL
1,5 M Tris-HCl buf. tirp., pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl buf. tirp., pH 6,8	-	2,5 mL
dH₂O	2,3 mL	6,1 mL
10 % SDS	100 µL	100 µL
10 % APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL
Galutinis tūris	~ 10 mL	~ 10 mL

Gelių polimerizacija ir elektroforezė vykdoma analogiškai skyrelio viršuje aprašytam metodui. Naudojamas 5 kartus skiestas Tris-Glicino elektrodinis buferinis tirpalas. Elektroforezė koncentruojančiame gelyje vykdoma 20 mA srove, o skiriamajame 25 mA srove, ~ 2 val.

2.2.8. Dažymas su SilverExpress staining rinkiniu

Gelis dažomas naudojant komercinį SilverExpress staining rinkinį. Elektroforezės gelis 10 minučių fiksuojamas fiksavimo tirpale (200 mL). Fiksavimo tirpalas nupilamas ir užpilama 100 mL jautrumą didinantis tirpalas (angl. *Sensitizer*). Po 10 min tirpalas nupilamas, užpilama nauja tirpalo porcija ir laikoma 10 minučių. Gelis du kartus plaunamas dejonizuotu vandeniu (200 mL) po 5 min. Vanduo nupilamas ir užpilamas dažantis tirpalas (angl. *Staining solution*), inkubuojama 15 min. Nupylus dažymo tirpalą gelis du kartus plaunamas su dejonizuotu vandeniu (200 mL) po 5 min. Vanduo nupilamas, gelis inkubuojamas ryškinimo tirpale (angl. *Developer*) iki kol pradeda matytis juostos. Kai pasiekiamas norimas juostelių ryškumas ant gelio užpilama 5 mL reakciją stabdančio tirpalo (angl. *Stop solution*). Stabdymo tirpalas nupilamas ir gelis plaunamas 3 kartus su dejonizuotu vandeniu po 10 min (200 mL).

2.2.9. *S. cerevisiae* K2 toksino biocidiškumo įvertinimas

MB terpė (pH 4,0) išlydoma, atvėsinama ir plonu sluoksniu užpilama į Petri lėkštelę. Sluoksnis išdžiovinamas ir formuojamas antras sluoksnis iš MB terpėje (pH 4,0) giluminiu būdu užsėto toksinams jautraus α '1 kamieno. Sluoksniams sustingus formuojami 10 mm skersmens šulinėliai, į kuriuos įnešama po 100 μ l tiriamojo mėginio. Inkubuojama 2 paras 25 °C temperatūroje ir matuojamas aplink duobutę susidariusios lizės zonos dydis. Toksino aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = 10^{\frac{R}{5}} \times 10 \quad (1)$$

kur R – lizės zonos spindulys (mm), A – toksino aktyvumas, išreikštas santykiniais vienetais (U/mL) (Schmitt & Tipper, 1990; Gulbinienė *et al.*, 2004; Kurzweilová & Sigler, 1995).

2.2.10. Biocidinio profilio nustatymas

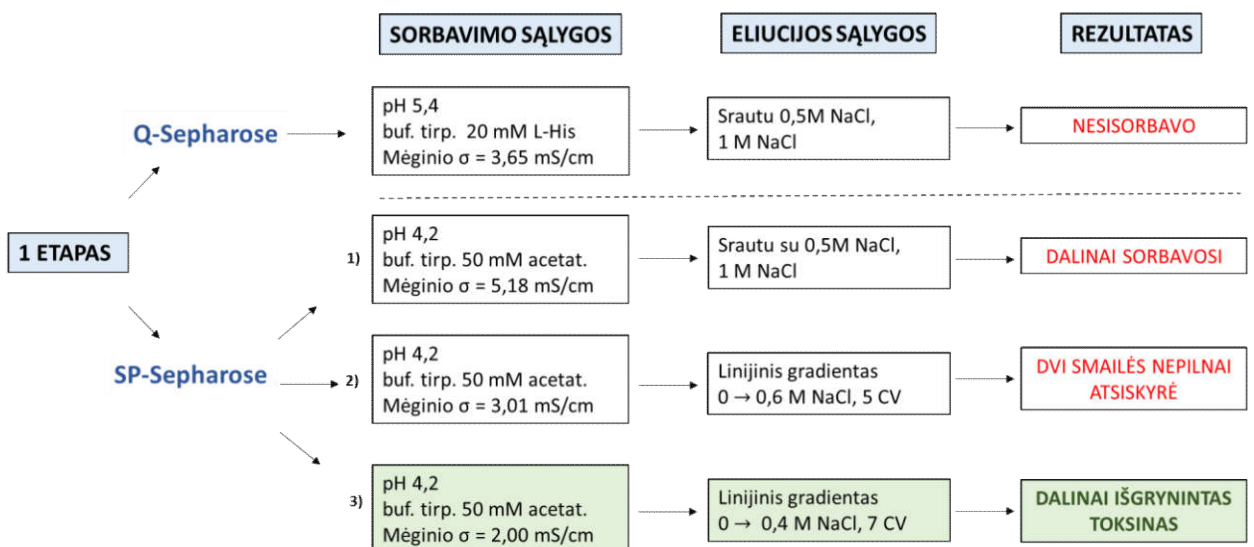
Į Petri lėkštelės plonu sluoksniu išpilstoma MB terpė, tokiu būdu suformuojamas pirmas sluoksnis. Išdžiūvus apatiniam sluoksniui, formuojamas antras sluoksnis iš MB terpėje (pH 4,0) giluminiu būdu užsėto testuojamo mielių kamieno. Sluoksniams sustingus suformuojami 10 mm skersmens šulinėliai, į kuriuos įnešama po 100 μ l K2 toksino. Lėkštelės 2 paras inkubuojamos 25 °C temperatūroje ir vertinamas toksino biocidiškumas prieš kitų mielių kamienus pagal susidariusias aplink duobutes lizės zonas (Somers & Bevan, 1969; Naumova & Naumov, 1973).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Susidomėjimą toksinų gryninimu ir savybių tyrimu skatina galimi medicininiai bei pramoniniai pritaikymai. Siekiant panaudoti toksinų savybes, svarbu gauti išgrynintą ir aktyvų baltymą (Santos *et al.*, 2015). Šiuo darbu siekiama sukurti optimalią *S. cerevisiae* K2 toksino gryninimo schemą bei ištirti biocidines savybes prieš gamtoje sutinkamas mieles.

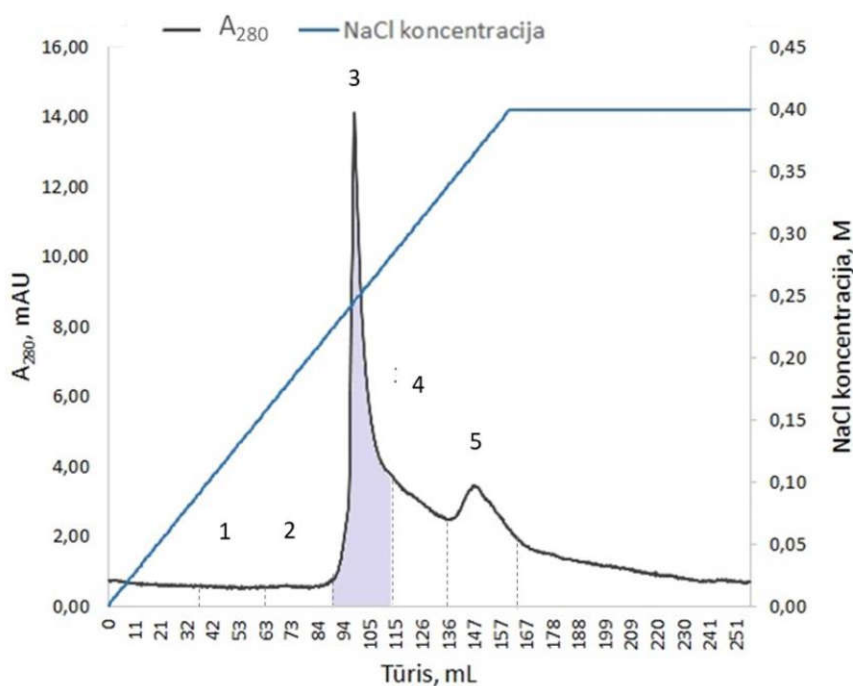
3.1. Pirmas chromatografinio gryninimo etapas

Mielių *S. cerevisiae* kamienas 4 paras auginamas toksino išskyrimo terpėje (pH 4,0) 18 °C temperatūroje. Tokiomis sąlygomis į terpę išskiriama daugiausia toksino, o pH 4,0 aplinkoje, K2 toksino aktyvumas yra didžiausias (Lebionka, *et al.*, 2002). Visi chromatografinio gryninimo žingsniai atliekami šaldymo spintoje, 4 °C temperatūroje, siekiant išsaugoti baltymo struktūrą. K2 mikocinas yra aktyvus, tačiau jo išskiriama mažais kiekiais. Mielių išskiriamo toksino išeiga iš 3 litrų sekrecinės terpės yra mažesnė nei 1 μg (Podoliankaitė *et al.*, 2014; Lebionka *et al.* 2002). Todėl prieš chromatografinį gryninimą, 1 litras sekrecinės terpės filtruojamas ir sukonzentruojamas iki 40 mL. Pirmam gryninimo etapui iš pradžių pasirenkamas anijonitas Q-Sepharose sorbentas, remiantis kito anijonito Mono Q sėkmingu panaudojimu *Pichia anomala* WC 65 toksino gryninimui (Sawant *et al.*, 1989). Gryninimo metu naudojama Q-Sepharose kolonėlė, nulygsvarinta 20 mM L-His buferiniu tirpalu, pH 5,4. Tačiau toksinas prie sorbento nesisorbavo. Be to, gryninimo metu naudojamas per didelis pH, kuriame toksinas neaktyvus, todėl sorbentas pakeistas į priešingo krūvio SP-Sepharose jonitą. Siekiant atskirti ląstelių sekretuojamas baltymines priemaišas nuo toksino, pritaikyti skirtingi sorbavimo ir eliuavimo būdai (21 pav).



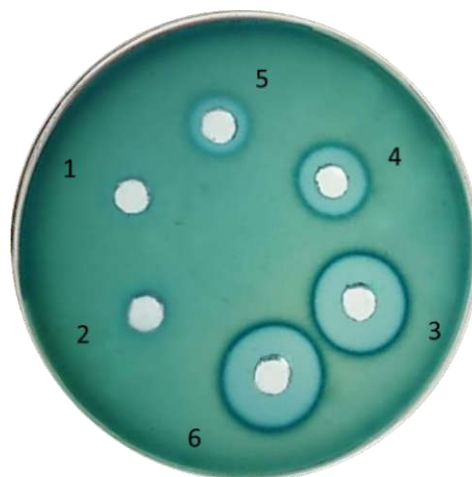
21 pav. Pirmo gryninimo etapo optimalių sąlygų parinkimo schema

Pirmiausia sukonzentruota toksino išskyrimo terpė 3 kartus praskiedžiama 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu. Terpės laidumas sumažinamas nuo 9,9 mS/cm iki 5,18 mS/cm. Eksperimento metu naudojamas pH 4,2, tinkamas toksino aktyvumo pasireiškimui. Toksino eliucija vykdoma srautu su 0,5 M NaCl, po to su 1 M NaCl. Šiomis eksperimento sąlygomis toksinas neprisijungė prie sorbento, dėl terpėje esančių priemaišinių jonų. Eksperimentas kartojamas sumažinus terpės laidumą iki 3,01 mS/cm. Toksinas eliuojamas linijiniu gradientu nuo 0 iki 0,6 M NaCl 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale 5 kolonos tūriais. Gautos dvi sunkiai atsiskiriančios smailės, todėl nuspręsta dar kartą pakeisti eliucijos sąlygas. Mėginys sorbuojamas ant SP-Sepharose jonito esant pH 4,2 ir mėginio laidumui 2,00 mS/cm. Toksinas eliuojamas taikant linijinį gradientą nuo 0 iki 0,4 M NaCl 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale 7 kolonos tūriais. Gryninimo metu renkamos frakcijos po 15 mL ir tikrinamas jų aktyvumas (22 ir 23 pav.).



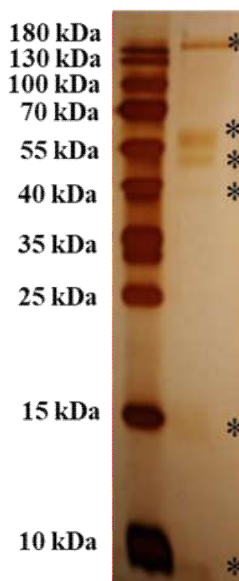
22 pav. SP-Sepharose gryninimo metu gauta chromatograma. SP-Sepharose kolonėlė (15 mm × 130 mm), nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2). Pilka spalva pažymėta didžiausią aktyvumą turinti frakcija

Toksinas eliuojasi pasiekus 0,2 M NaCl koncentraciją, laidumui keičiantis nuo 6,5 mS/cm iki 11,5 mS/cm. Gryninimo metu atsiskiria dvi smailės, o didžiausiu aktyvumu (100 U/mL) pasižymi frakcija, chromatogramoje atitinkanti 3 numeriu pažymėtą smailę (23 pav.).



23 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas. 1, 2, 3, 4, 5 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 6 - K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą

Paveiksle 1 ir 2 numeriu pažymėtos frakcijos aktyvumo neturi. Chromatogramos smailės nuolydžio 4 numeriu pažymėtoje duobutėje aktyvumas 25,1 U/mL. Kitos smailės frakcija atitinka Nr.5 pažymėtą duobutę – joje aktyvumas yra mažas (15,9 U/mL). Nr.6 pažymėtoje duobutėje K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą (100 U/mL). Didžiausią aktyvumą turinti frakcija Nr.3 sukonzentruojama 20 kartų centrifuguojant mėgintuvėliuose su 3 kDa pralaidžia membrana ir patikrinamas supernatanto grynumas (24 pav.).

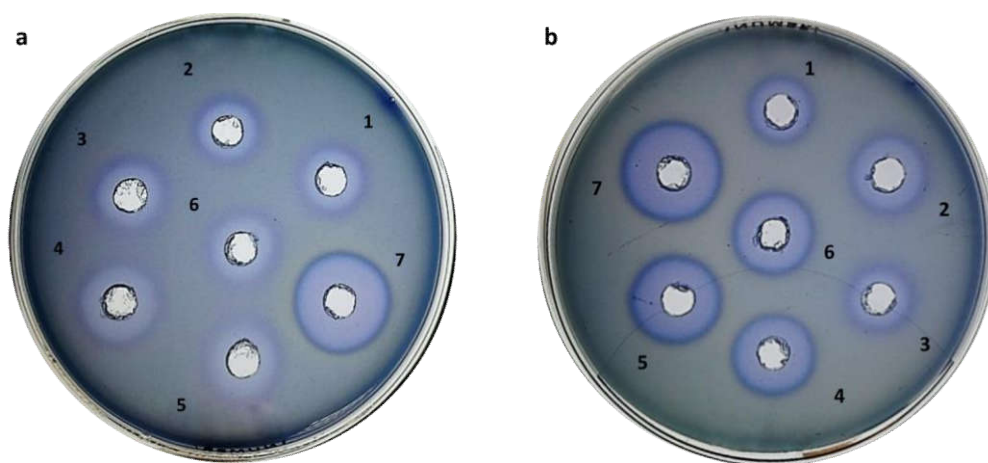


24 pav. Tris-Glicino SDS poliakrilamidinio gelio (15 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis (žvaigždute pažymėtos atsiskyrusios juostos)

Elektroforetinės analizės metu paaiškėjo, jog po SP-Sepharose chromatografijos toksinas nebuvo pilnai išgrynintas – mėginyje buvo priemaišų. Gautos didelio molekulinio svorio (apie 180 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 40 kDa) juostos ir mažo molekulinio svorio (apie 15 kDa, 10 kDa) juostos. Norint sumažinti priemaišas reikalingas dar vienas gryninimo etapas.

3.2. Antras chromatografinio gryninimo etapas

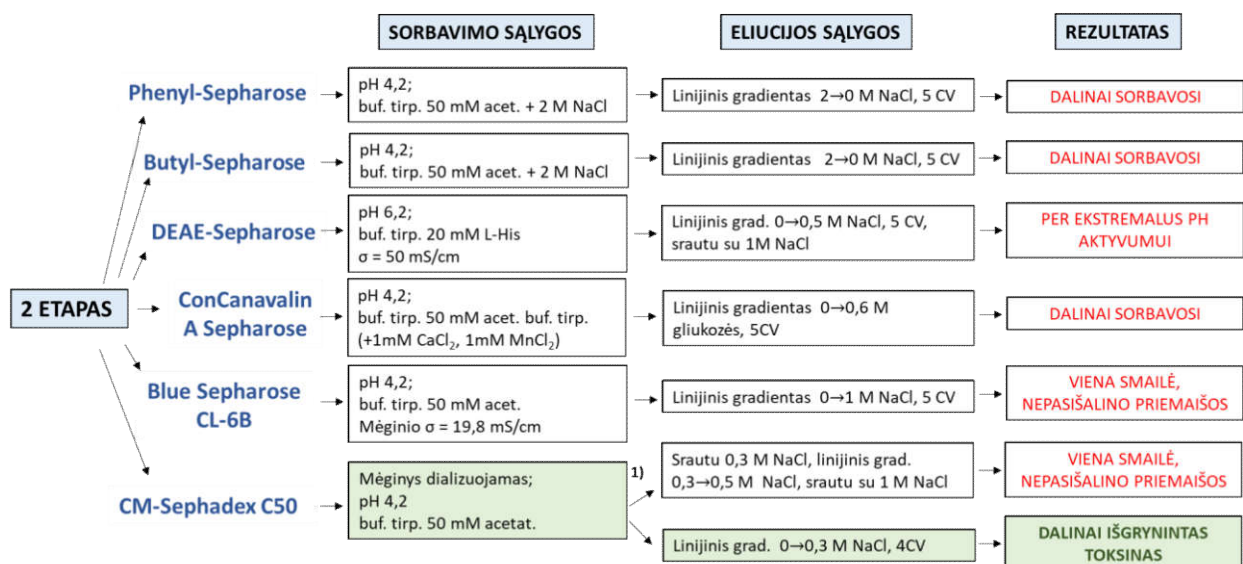
Po jonų mainų chromatografijos mėginyje lieka NaCl perteklius ir priemaišos, siekiant jas sumažinti optimizuojama antra gryninimo stadija (26 pav.). Remiantis baltymo aminorūgščių seka, baltymo α subvieneto N-galinė dalis yra hidrofobinė (Dignard *et al.*, 1991; von Heijne, 1986), todėl nuspręsta antrame etape pritaikyti hidrofobinės sąveikos chromatografiją. Baltymo gryninimui išbandytos Phenyl-Sepharose ir Butyl-Sepharose kolonėlės, nulygsvarintos 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2), turinčiu 2 M NaCl. Toksino eliucijai pritaikytas linijinis gradientas nuo 2 M iki 0 M NaCl lygsvarinimo buferiniame tirpale. Toksinas prie hidrofobinių sorbentų jungėsi tik dalinai – biocidinis aktyvumas aptiktas prie sorbento nesisorbavusiuose (nr. 1, 2, 3) ir sorbavusiuose (nr. 4, 5, 6) mėginiuose (25 pav.).



25 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas po hidrofobinės chromatografijos. a - Phenyl-Sepharose, b - Butyl-Sepharose (1,2,3,4,5,6 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 7 – K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą)

Prie Phenyl-Sepharose sorbento nesisorbavusių frakcijų (25 pav. a) nr. 1, 2 ir 3 aktyvumas mažiausias – 25,1 U/mL. Didesniu aktyvumu (39,8 U/mL) pasižymi prie sorbento sorbavusios frakcijos nr. 4, 5, 6. Butyl-Sepharose chromatografijos metu (25 pav. b) didžiausią aktyvumą taip pat turėjo prie sorbento sorbavusios frakcijos – nr. 5 (63,1 U/mL) bei nr. 4 ir nr. 6 (50,0 U/mL). Nesisorbavusios frakcijos pasižymėjo mažesniu aktyvumu – nr. 1, 3 aktyvumas 25,1 U/mL, o nr. 2 aktyvumas 39,8 U/mL. Lėkštučių duobutėse, pažymėtose nr. 7, K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą, kurio aktyvumas 100,0 U/mL. Toksino aktyvumas stebimas visose frakcijose, todėl šis metodas nėra tinkamas toksino išgryninimui.

Pritaikyta jonų mainų chromatografija naudojant DEAE-Sepharose jonitą, šis sorbentas buvo sėkmingai panaudotas mielių *Kluyveromyces wickerhamii* Kwkt toksino išgryninimui (Comitini & Ciani, 2011), bet kadangi gryninimo metu naudojamas aukštas pH (pH 6,2) toksinas denatūruoja ir praranda aktyvumą.



26 pav. Antro gryninimo etapo optimalių sąlygų parinkimo schema

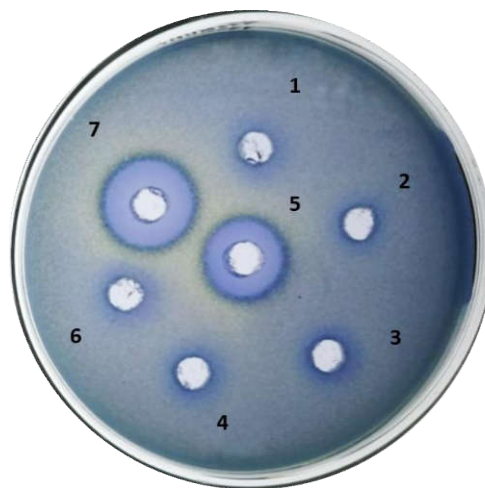
K2 toksinas yra glikoproteinas, todėl išbandyta afininė chromatografija, kuriai būdinga stipri biospecifinė sąveika tarp receptorių (glikoproteinų) ir įvairių ligandų. Pritaikydami afininę chromatografiją mokslininkai sėkmingai išgrynino Zigociną (Weiler *et al.*, 2002), K1 toksiną (Hutchins & Bussey, 1983). K2 toksino grynimui parenkama ConCanavalin A Sepharose kolonėlė, nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2) turinčiu 1 mM CaCl₂ ir 1 mM MnCl₂. Toksino eliucija vykdoma linijiniu gradientu nuo 0 iki 0,6 M gliukozės 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale 5 kolonos tūriais. Prie sorbento toksinas jungėsi tik iš dalies, nes biocidinis aktyvumas pastebėtas prie sorbento nesisorbavusiose (nr. 2, 3, 4, 5, 6) ir sorbavusiose frakcijose (nr. 7, 8, 9, 10) (27 pav.).



27 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas po afininės chromatografijos. 1 – K2 toksiną sekretuojančių *S. cerevisiae* mielių kolonija, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – chromatografinio gryninimo frakcijos

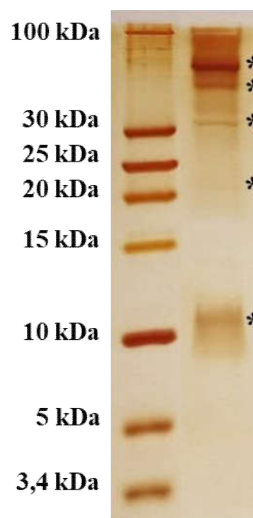
Didžiausią aktyvumą turi sorbavusi frakcija nr. 7 (25,1 U/mL), mažesnis aktyvumas (19,9 U/mL) nr. 8, 9, 10 frakcijose ir nesisorbavusioje nr. 4 frakcijoje. Kitose frakcijose aktyvumas mažesnis – nr. 3, 5, 6 aktyvumas 15,9 U/mL, o nr. 2 – 12,6 U/mL. Afininės chromatografijos metodas nebuvo tinkamas toksino išgryninimui, nes toksinas išsiskirstė visose frakcijose.

Išbandytas giminingumo chromatografijos Blue-Sepharose CL-6B sorbentas pasižymi afiniškumu daugeliui biomolekulių. Baltymai gali sąveikauti su Cibacron Blue 3G-A dažu ir prisijungti per elektrostatinę bei hidrofobinę sąveiką su aromatinio anijoniniu ligandu (Subramanian & Ross, 1984). K2 toksino grynimui parinktos sąlygos pH 4,2 ir joninė jėga 19,8 mS/cm. Naudojama Blue-Sepharose CL-6B kolonėlė nulygsvarinama su 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2). Toksinas eliuojamas taikant linijinį gradientą nuo 0 iki 1 M NaCl lygsvarinimo buferiniame tirpale 5 kolonos tūrius. Toksinas prisijungė prie sorbento, tačiau po chromatografinio gryninimo priemonės nepasišalino (28 ir 29 pav.).



28 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas po Blue-Sepharose CL-6B chromatografijos (1, 2, 3, 4, 5, 6 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 7 – K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą)

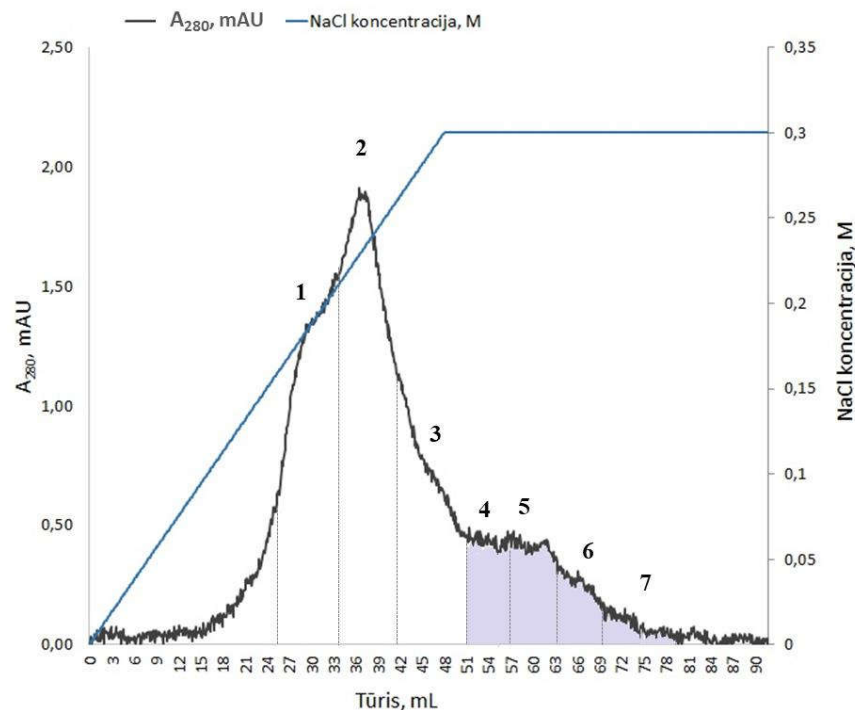
Prie sorbento sorbavusios frakcijos nr. 5 aktyvumas 50,1 U/mL. Kontrolinio mėginio (K2 toksino prieš chromatografinį gryninimą) aktyvumas 100,0 U/mL. Kitose frakcijose aktyvumo nebuvo. Mėginys su didžiausiu aktyvumu sukonzentruojamas 20 kartų centrifuguojant (membranos pralaidumas nuo 3 kDa) ir jo grynumas įvertinamas elektroforetiškai (29 pav.).



29 pav. Tris-Tricino SDS poliakrilamidinio gelio (16 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis (žvaigždute pažymėtos atsiskyrusios juostos)

Elektroforezės metu paaiškėjo, jog nr. 5 mėginyje buvo priemaišų. Gautos apie 80 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 10 kDa dydžio juostos. Todėl šis metodas nebuvo tinkamas.

Toliau baltymas gryninamas su CM-Sephadex C50 sorbentu, skirstančiu junginius pagal joninę jėgą ir molekulinį svorį. Po SP-Sepharose chromatografinio gryninimo aktyvumą turintis mėginys (15 mL) dializuojamas 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale (pH 4,2), siekiant pašalinti NaCl. Susorbavus mėginį iš pradžių toksinas eliuojamas srautu su 0,3 M NaCl, tada linijiniu gradientu nuo 0,3 iki 0,5 M NaCl 4 kolonos tūrius ir srautu su 1 M NaCl. Pastebėta, jog mėginys eliuavosi ties 0,3 M NaCl koncentracija ir neatsiskyrė priemaišos. Nutarta taikyti linijinį 4 kolonos tūrių gradientą nuo 0 iki 0,3 M NaCl 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale (pH 4,2). Šios optimalios gryninimo sąlygos ir CM-Sephadex C50 sorbentas pasirenkamas kaip galutinis antros stadijos metodas, toliau gryninant pirmo etapo metu gautą mėginį (30 pav.).



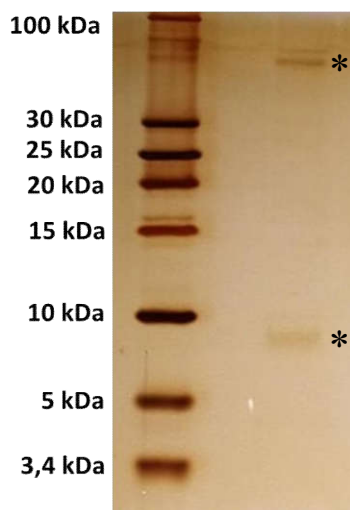
30 pav. CM-Sephadex gryninimo metu gauta chromatograma. Naudojama CM-Sephadex C-50 sorbentu užpildyta kolonėlė (10 mm × 120 mm), nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2). Pilka spalva pažymėtos aktyvumą turinčios frakcijos

Toksinas eliuojamas pasiekus 0,3 M NaCl koncentraciją. Gryninimo metu renkamos frakcijos ir tikrinamas jų aktyvumas. Aktyvumu pasižymi frakcijos chromatogramoje atitinkančios 4, 5, 6 ir 7 numeriais pažymėtą piką (31 pav.).



31 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – chromatografinio gryninimo frakcijos, 8 – K2 toksinas po pirmos chromatografijos stadijos ir dializės, 9 – K2 toksinas prieš gryninimą

Didžiausias aktyvumas (50,1 U/mL) 5 numeriu pažytoje duobutėje. Kitos piko frakcijos atitinka nr. 4, 6 ir 7 duobutes – jose aktyvumas mažesnis (39,8 U/mL). Nr. 8 duobutėje – K2 toksinas po pirmo SP-Sepharose gryninimo ir dializės (79,4 U/mL), o nr. 9 duobutėje – K2 toksinas prieš chromatografinį gryninimą (100,0 U/mL). Nuo 1 iki 3 numerio pažymėtos frakcijos aktyvumo neturi. Chromatogramoje (30 pav.) pilka spalva pažymėtos, didžiausią aktyvumą turinčios frakcijos apjungiamos ir sukonzentruojamos apie 100 kartų per 3 kDa pralaidžią membraną. Sukonzentruoto mėginio grynumas tikrinamas elektroforezės metu (32 pav.).

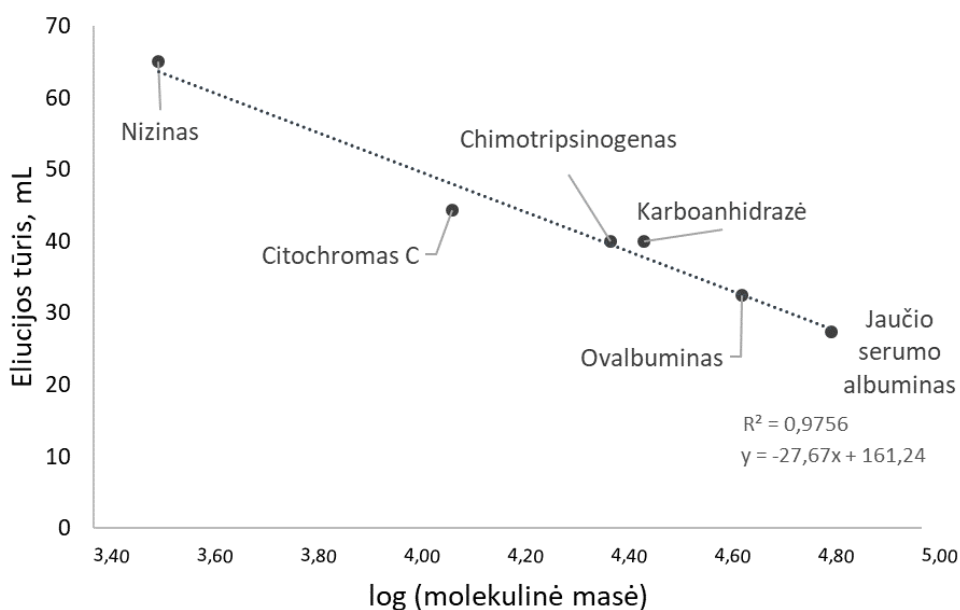


32 pav. Tris-Tricino SDS poliakrilamidinio gelio (16 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis (žvaigždute pažymėtos atsiskyrusios juostos)

Elektroforetinės analizės metu pastebėta, jog mėginyje yra skirtingų dydžių junginiai. Elektroforezėje atsiskyrė dvi juostos (viena didelio, o kita mažo molekulinio svorio). Norint įvertinti toksino dydį bei atskirti didelės molekulinės masės junginį nuo mažos toliau vykdoma gelfiltracija.

3.3. Trečias chromatografinio gryninimo etapas

Siekiant atskirti didelės molekulinės masės junginį nuo mažos bei patikslinti medžiagos dydį, po dviejų gryninimo etapų vykdoma gelfiltracija. Naudojamas Sephadex G-75 sorbentas, kurio atskyrimo riba yra nuo 3 000 – 80 000 Da. Prieš gryninimą kolona nulygsvarinama 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu, turinčiu 0,1 M NaCl (pH 4,2) ir kalibruojama su standartiniais žinomos molekulinės masės baltymų tirpalais: nizinu, citochromu c, chimotripsinogenu, karboanhidraze, ovalbuminu, jaučio serumo albuminu. Į kilpą suleidžiama 250 μ L baltymo tirpalo (koncentracija 0,5 mg/mL) ir jis susiurbiamas ant Sephadex G75 sorbento. Baltymas eliuojamas 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2) esant 0,1 M NaCl koncentracijai. Baltymų chromatogramose gaunama viena smailė, kurią integruojant nustatoma baltymo sulaikymo trukmė. Nizinas, kurio molekulinė masė 3 354 Da, eliuavosi ties 65,0 mL, citochromas c ($M = 12\,384$ Da) eliuavosi ties 44,3 mL, chimotripsinogenas ($M = 25\,000$ Da) eliuavosi ties 39,9 mL, karboanhidrazės ($M = 29\,000$ Da) eliuacijos tūris – 40,0 mL, ovalbumino ($M = 45\,000$ Da) – 32,5 mL, o jaučio serumo albumino ($M = 67\,000$ Da) – 27,4 mL. Suintegruojamos visos penkios chromatogramos ir nubrėžiama kalibracinė kreivė. Atlikus tiesinę aproksimaciją, gaunama tiesės lygtis ir tiesinės korealiacijos koeficientas (33 pav.)

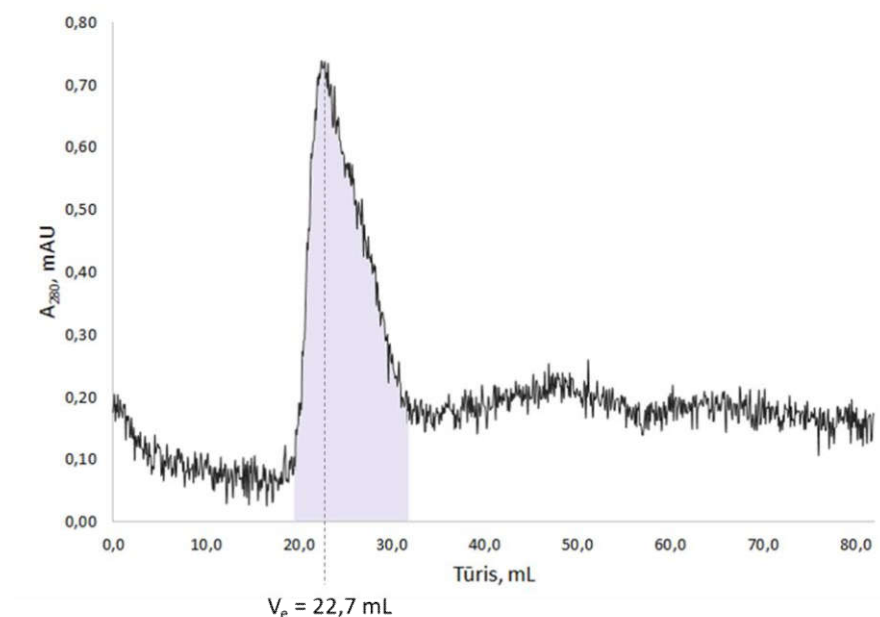


33 pav. Baltymo molekulinės masės nustatymas gelfiltracijos metodu. Naudojama Sephadex G75 sorbentu užpildyta kolonėlė (16 mm $\times$ 340 mm), nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu su 0,1 M NaCl (pH 4,2) (nizino eliuacijos tūris – 65,0 mL, citochromo c – 44,3 mL, chimotripsinogeno – 39,9 mL, karboanhidrazės – 40,0 mL, ovalbumino – 32,5 mL, jaučio serumo albumino – 27,4 mL)

Tiesės korealiacijos koeficientas R yra artimas vienetui, todėl galima teigti, jog tarp molekulinų masių dešimtainių logaritmų reikšmių ir sulaikymo trukmės reikšmių yra tiesinė

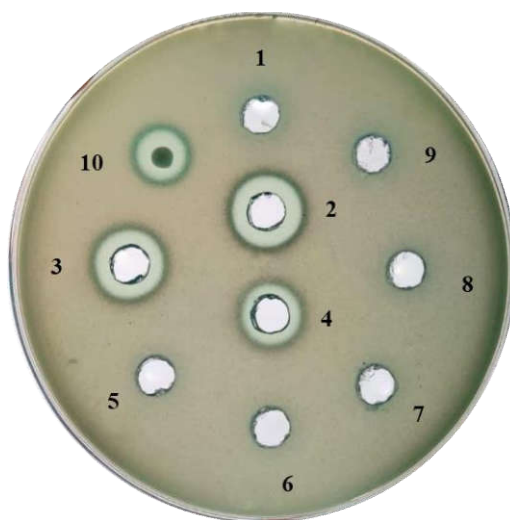
priklausomybė. Žinant baltymo sulaikymo trukmę ir pasinaudojant kalibracinės kreivės tiesine lygtimi, galima nustatyti jo molekulinę masę.

Prieš atliekant gelfiltraciją, yra surenkami trys dviem žingsniais išgryninti mėginiai, jie apjungiami, koncentruojami iki 250 μ L. Mėginys suleidžiamas į kilpą ir susiurbiamas ant Sephadex G75 sorbento. Baltymas eliuojamas su 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 4,2) esant 0,1 M NaCl koncentracijai. Gelfiltracijos metu renkamos frakcijos ir tikrinamas jų aktyvumas (34 ir 35 pav.).



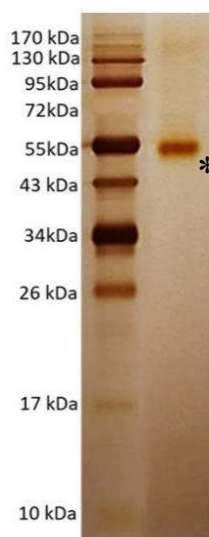
34 pav. Gelfiltracijos metu su Sephadex G75 sorbentu gauta chromatograma. Sephadex G75 sorbento kolonėlė (16 mm $\times$ 340 mm) nulygsvarinta 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu su 0,1 M NaCl (pH 4,2). Pilka spalva pažymėta aktyvumą turinti smailė, kurios eliuacijos tūris – 22,7 mL

Sephadex G75 gelfiltracijos metu atsiskyrė dvi smailės, kurių eliuacijos tūriai – 22,7 mL ir 47,5 mL. Didžiausią aktyvumą turi chromatogramoje pilka spalva pažymėta smailė (eliucijos tūris 22,7 mL) (35 pav.).



35 pav. Toksino aktyvumo įvertinimas. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 – chromatografinio gryninimo metu rinkti mėginiai, 10 - K2 toksiną sekretuojančių *S. cerevisiae* mielių kolonija

Paveiksle nr. 2, 3 ir 4 pažymėtose duobutėse esantys mėginiai atitinka chromatogramoje (34 pav.) pilka spalva pažymėtą smailę (V_e 22,7 mL). Kituose chromatografijos metu rinktuose mėginiuose (pažymėti nr. 1, 5 – 6) aktyvumo nebuvo. Didžiausiu aktyvumu pasižymi nr. 2 ir 3 pažymėtose duobutėse esantys mėginiai (31,63 U/mL), nr. 4 pažymėtoje duobutėje aktyvumas mažesnis (15,89 U/mL). Aktyvumą turintys mėginiai apjungiami (10 mL) ir sukonzentruojami centrifuguojant mėgintuvėliuose (per 3 kDa pralaidžią membraną). Sukonzentruotas mėginys analizuojamas elektroforetiškai (36 pav.). Elektroforezė atliekama neredukuotomis sąlygomis. Norint įvertinti baltymo dydį redukuojančiomis sąlygomis, reikalinga daugiau medžiagos. Kadangi K2 toksino išskiriama mažais kiekiais (1 μ g iš 3 L terpės) norint pamatyti baltymo juostą, mėginys sukonzentruojamas apie 130 kartų. Maksimaliai sukonzentruoto mėginio pakanka vienam elektroforezės eksperimentui.



36 pav. Tris-Glicino SDS poliakrilamidinio gelio (15 %) elektroforezė neredukuojančiomis sąlygomis

Atlikus elektroforetinę analizę, gauta 55 kDa dydžio juosta. Literatūroje minimas toksino dydis – 38,7 kDa (Dignard *et al.*, 1991). Elektroforezėje dydžio neatitikimas galimas dėl baltymo struktūrinių savybių – toksinas yra glikoproteinas, turintis 3 galimas glikozilinimo vietas (Dignard *et al.*, 1991). Pastebėtas mažesnis natrio dodecilsulfato (SDS) prisijungimas prie glikozilintų baltymų – 1 g žmogaus eritrocito membranos glikoproteinas prisijungia 0,38 g SDS, tuo tarpu 1 g jaučio serumo albumino prisijungia 0,73 g SDS. Mažiau SDS prisijungus prie glikoproteino, gaunamas mažesnis krūvio/masės santykis, nei standartinių polipeptidų. Todėl polipeptidai, turintys prisijungusių angliavandenių, elektroforezės gelyje eina greičiau, neproporcingu jų molekulinei masei (Segrest, Jackson, Andrews, & Marchesi, 1971).

Naudojantis kalibracinės kreivės lygtimi apskaičiuojama analizuojamos medžiagos molekulinė masė – 103 kDa. Neatitikimai galimi dėl K2 toksino aminorūgščių sekoje esančių cisteinų, kurie gali lemti oligomerinių struktūrų formavimąsi tirpale, agregaciją, todėl

gelfiltracijos metu eliuojamos didelės molekulinės masės molekulės. Be to, toksinas gali formuoti nekovalentines oligomerines formas tirpale dėl hidrofobinės ar elektrostatinės sąveikos.

3.4. K2 toksino biocidinio aktyvumo profilis

K2 toksino aktyvumas jau įrodytas prieš žmogaus patogenines *Candida tropicalis* mieles, patogenines *Aspergillus flavus* dirvožemo mieles, *Rhizopus* grybą, parazituojančią augalus, vaisius bei daržoves, *Penicillium* pelėsius (Parveen & Begum, 2010). Taip pat K2 aktyvus prieš *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis* bei kitų *S. cerevisiae* kamienų sferoplastus. Panašaus veikimo mechanizmo toksinas K1 pasižymi panašiu mikroorganizmų žudymo profiliu, tačiau, priešingai K2 toksinui, nėra aktyvus prieš *Candida tropicalis* (Zhu & Bussey, 1989). Kadangi K2 toksinas aktyvus prieš įvairias patogenines žmogaus, augalų mieles, jį aktualu pritaikyti infekcijų gydymui, augalų, grūdų, dirvožemio apsaugojimui ar kuriant priemones nuo pelėsių. Šiuo tyrimu siekiama praplėsti K2 toksino biocidinių savybių pritaikymo galimybes įvairiose srityse.

K2 toksino aktyvumas įvertinamas prieš įvairius mielių kamienus. Tyrimas atliktas Gamtos tyrimų centre, Genetikos laboratorijoje. K2 toksino poveikis tirtas 24 gamtiniais mikroorganizmams: *Candida argentea*, *Candida boidinii*, *Candida californica*, *Candida oleophila*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania aerobia*, *Kazachstania africana*, *Kazachstania bulderii*, *Kazachstania servazzi*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia terricola*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces cerevisiae* α '1, bei skirtingus toksinus (K1, K2, K28, Klus) sintetintiems *Saccharomyces cerevisiae* kamienams.

K2 toksino biocidinis aktyvumas testuojamas ant MB lėkštelių (pH 4,0) su užsėtu giluminiu tiriamos kultūros sluoksniu. Terpėje padaroma duobutė ir į ją įlašinamas negrynintas K2 toksinas. Aplink toksino mėginį susidariusios skaidrios lizės zonos atitinka mielių augimo slopinimą. Tyrimų metu nustatyta, kad *S. cerevisiae* M437 kamieno išskiriamas K2 toksinas biocidiškai veikia 11 rūšių ištirtų mielių (6 lentelė).

Eksperimento metu matuojamas susidariusios lizės zonos dydis (mm) ir apskaičiuojamas toksino aktyvumas, pagal 2.4.1 skyrelyje pateiktą formulę (1). K2 toksino aktyvumas prieš kiekvieną mielių rūšį tikrinamas tris kartus, apskaičiuojamas standartinis nuokrypis. Didžiausias toksino aktyvumas ($63,2 \pm 4,7$ U/mL) pasireiškia prieš visų tipų toksinams jautrų *Saccharomyces cerevisiae* α '1 kamieną. Prieš kitas *S. cerevisiae* mieles ir jų išskiriamus toksinus K2 aktyvumas mažesnis. Prieš K1 toksiną išskiriantį *S. cerevisiae* kamieną K2 aktyvumas $39,8 \pm 3,8$ U/mL (37 % mažiau nei prieš *S. cerevisiae* α '1). Prieš vėliausiai aptiktą *S. cerevisiae* dgRNR koduojamą Klus toksiną K2 pasižymi $31,6 \pm 2,0$ U/mL biocidiniu aktyvumu, 50 % mažesniu nei prieš α '1

kamieną. Prieš K28 toksiną K2 aktyvumas siekia $25,1 \pm 2,4$ U/mL (tai 60 % mažiau nei prieš $\alpha'1$).

Toksinas biocidiniu aktyvumu taip pat pasižymi prieš *S. cerevisiae* giminias *Saccharomyces paradoxus* mieles ($20,0 \pm 1,9$ U/mL), prieš *Kazachstania servazzi* kamieną ($25,1 \pm 1,9$ U/mL), *Kazachstania africana* ($20,0 \pm 1,5$ U/mL), *Kazachstania aerobia* ($15,9 \pm 1,4$ U/mL) ir *Pichia terricola* ($15,9 \pm 1,5$ U/mL). Mažiausias K2 toksino aktyvumas ($12,6 \pm 1,2$ U/mL) pastebėtas prieš *Candida zemplinina* ir *Kluyveromyces thermotolerans* mikroorganizmus.

6 lentelė. K2 aktyvumo tyrimo prieš įvairius gamtinius mikroorganizmus rezultatai (lizės zonų dydžiai, diametras, mm: + + + + (4), + + + (3), + + ± (2,5), + + (2), + ± (1,5), + (1), ± (0,5), - (0))

Mikroorganizmai	K2 toksino aktyvumas
<i>Candida argentea</i>	-
<i>Candida boidinii</i>	-
<i>Candida californica</i>	-
<i>Candida oleophila</i>	-
<i>Candida zemplinina</i>	±
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-
<i>Kazachstania aerobia</i>	+
<i>Kazachstania africana</i>	+ ±
<i>Kazachstania bulderii</i>	-
<i>Kazachstania servazzi</i>	+ +
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	±
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-
<i>Pichia anomala</i>	-
<i>Pichia fermentans</i>	-
<i>Pichia kluyveri</i>	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-
<i>Pichia terricola</i>	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K1)	+ + +
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K2)	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (K28)	+ +
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Klus)	+ + ±
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> $\alpha'1$	+ + + +
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	+ ±
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-

Remiantis šio tyrimo metu gautais toksino aktyvumo rezultatais, matyti, jog toksinas pasižymi aktyvumu prieš vyno mieles (*Candida zemplinina*, *Pichia terricola*, *Kluyveromyces thermotolerans*). Šią savybę aktualu pritaikyti vyno gamyboje, siekiant išvengti mielių

pertekliaus, užsikrėtimo nenaudingomis laukinėmis mielėmis, siekiant subalansuoti vyno kvapą, skonį bei alkoholio kiekį (Padilla, Gil & Manzanares, 2016).

Atlikus biocidinių savybių tyrimą, K2 toksino poveikiui jautrūs *Sacharomyces* genties atstovai, mažiau jautrūs poveikiui *Kazachstania servazzi*, *Kazachstania africana*, *Kazachstania aerobia*, *Pichia terricola*, *Candida zemplinina* ir *Kluyveromyces thermotolerans* mikroorganizmai. K2 toksinas nepasižymi aktyvumu prieš: *Candida argentea*, *Candida boidinii*, *Candida californica*, *Candida oleophila*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania bulderii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii* ir *Torulaspora delbrueckii* mielių rūšis.

IŠVADOS

1. SP-Sepharose sorbentas, taikant eliacijai linijinį NaCl gradientą, tinkamas naudoti pirmuoju K2 toksino gryninimo etapu.
2. Iš antrame gryninimo etape taikytų hidrofobinės, afininės, jonų mainų chromatografijos sorbentų CM Sephadex C50 yra optimalus K2 toksinui gryninti.
3. Po trijų chromatografinio gryninimo etapų gaunamas aktyvus K2 baltymas.
4. K2 toksino poveikiui yra jautrūs: *Saccharomyces cerevisiae* α '1, bei K1, K2, K28, Klus toksinus sintetinantys *Saccharomyces cerevisiae* kamienai, *Saccharomyces paradoxus*, *Kazachstania servazzi*, *Kazachstania africana*, *Kazachstania aerobia*, *Pichia terricola*, *Candida zemplinina*, *Kluyveromyces thermotolerans* mikroorganizmai.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Ausubel, F. M. (1999). Current protocols in molecular biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.
- Bajaj, B. K., Sharma, S. (2010). Construction of killer industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1 and its fermentation performance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 477–485. doi: 10.1590/S1517-83822010000200030
- Chen, W., Han, Y. & Jong, S. (2000). Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5348–5352. doi: 10.1128/aem.66.12.5348-5352.2000
- Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 235–240. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x
- Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin : purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *Research Letter*, 316, 77–82. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D., Thomas, D. Y. (1991). Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Molecular Genetics and Genomics*. 227(1), 127–136. doi: 10.1007/BF00260717
- Esser, K. & Lemke, P. A. (1995). The Mycota. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Ferraz, P., Cássio, F. & Lucas, C. (2019). Potential of Yeasts as Biocontrol Agents of the Phytopathogen Causing Cacao Witches' Broom Disease: Is Microbial Warfare a Solution? *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-13. doi:10.3389/fmicb.2019.01766
- Francisco, P. & Ram, M. (2016). Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(10), 393–399. doi: 10.1023/a:1012034608908
- Gulbinienė, G., Kondraitienė, L., Jokantaitė, T., Servienė, E., Melvydas, V., Petkunienė, G. (2004). Occurrence of Killer Yeast Strains in Fruit and Berry Wine Yeast Populations. *Food Technology and Biotechnology*, 42(3), 159–163.
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L. & Suzuki, N. (2015). 50-plus years of

fungus viruses. *Virology*, 479-480, 356–368. doi:10.1016/j.virol.2015.02.034

Gier, S., Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2017). Expression of K1 Toxin Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* Mimics Treatment with Exogenous Toxin and Provides a Useful Tool for Elucidating K1 Mechanisms of Action and Immunity. *Toxins*, 9(345), 1–9. doi:10.3390/toxins9110345

Golubev, W. I. (2006). Antagonistic Interactions Among Yeasts, (12)10, 197–220. doi: 10.1007/3-540-30985-3_10

Hatoum, R., Labrie, S. & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts : from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), 1–12. doi:10.3389/fmicb.2012.00421

Hodgson, V. J., Button, D. & Walker, G. M. (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, 141, 2003–2012. doi: 10.1099/13500872-141-8-2003

Hutchins, K. & Bussey, H. (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *Journal of bacteriology*, 154(1), 161-169.

İzgü, F. & Altınbay, D. (2004). Isolation and Characterization of the K5-Type Yeast Killer Protein and Its Homology with an Exo-β-1,3-glucanase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(3), 685–693. doi:10.1271/bbb.68.685

İzgü, F., Altınbay, D. & Türeli, A. E. (2007). In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycin, a Novel Exo-β-1,3-Glucanase Isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Microbiology and Immunology*, 51(9), 797–803. doi:10.1111/j.1348-0421.2007.tb03975.x

Kagiyama, S., Aiba, T., Kadowaki, K. & Mogi, K. (1988). New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(1), 1–7. doi:10.1271/bbb1961.52.1

Kurzweilová, H. & Sigler, K. (1995). Comparison of three different methods for determining yeast killer toxin K1 activity and standardisation of units, *Experientia*, 51(1):26-28.

Lebionka, A., Serviené, E., Melvydas, V. (2002). Isolation and purification of yeast *Saccharomyces cerevisiae* K2 killer toxin. *Biologija*, 4, 7-9.

Liu, G. L., Wang, K., Hua, M. X., Buzdar, M. A. & Chi, Z.-M. (2012). Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Process Biochemistry*, 47(5), 822–827.

doi:10.1016/j.procbio.2012.02.016

Liu, G., Chi, Z., Wang, G., Wang, Z., Li, Y. & Chi, Z. (2013). Yeast killer toxins , molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551, 1–13. doi:10.3109/07388551.2013.833582

Liu, S. Q. & Tsao M. (2009). Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 280–2.

Lugtenberg, B. (2015). Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer International Publishing, Switzerland

Lukša, J., Serva, S., Servienė, E. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* K2 toxin requires acidic environment for unidirectional folding into active state. *Mycoscience*, 7, 51–57. doi:10.1016/j.myc.2015.08.003

Lukša, J., Podoliankaitė, M., Vepškaitė, I., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Urbonavičius, J., Servienė, E. (2015). Yeast β -1,6-Glucan Is a Primary Target for the *Saccharomyces cerevisiae* K2 Toxin. *Eukaryotic Cell*, 14(4), 406–414. doi:10.1128/ec.00287-14

Lukša, J., Vepškaitė-Monstavičė, I., Apšegaitė, V., Blažytė-Čereškienė, L., Stanevičienė, R., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Ravoitytė, B., Aleknavičius, D., Būda, V., Mozūraitis, R., Servienė, E. (2020). Fungal Microbiota of Sea Buckthorn Berries at Two Ripening Stages and Volatile Profiling of Potential Biocontrol Yeasts. *Microorganisms*, 8(3), 1–18. doi:10.3390/microorganisms8030456

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. & Polonelli, L. (1997) Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 369-400

Magliani, W., Conti, S., Travassos, L. R. & Polonelli, L. (2008). From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. *FEMS Microbiology Letters*, 288(1), 1–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01340.x

Magliani, W., Conti, S., Salati, A., Vaccari, S., Ravanetti, L., Maffei, D. & Polonelli, L. (2004). Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. *FEMS Yeast Research*, 5(1), 11–18. doi:10.1016/j.femsyr.2004.06.010

Meinhardt, F. & Klassen, R. (2009). Yeast Killer Toxins : Fundamentals and Applications. *Physiology and Genetics*, 7, 108–130. doi: 10.1007/978-3-319-71740-1_3

Meškauskas, A., Čitavičius, D. (1992). The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene*, 111, 135-9.

doi: 10.1016/0378-1119(92)90615-v

Naumova, T. & Naumov, G.I. (1973). Comparative genetics of yeast. XII. Study of antagonistic interrelations in *Saccharomyces yeast*. *Genetika*, 9, 85-90

Novotná, D., Flegelova, H. & Janderova, B. (2004). Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 803-13. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.04.007

Oro, L., Ciani, M., Bizzaro, D. & Comitini, F. (2016). Evaluation of damage induced by Kwkt and Pikt zymocins against *Brettanomyces/Dekkera* spoilage yeast, as compared to sulphur dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 207–214. doi:10.1111/jam.13121

Padilla, B., Gil, J. V. & Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7(411), 1–20. doi:10.3389/fmicb.2016.00411

Parveen, M., R. & Begum, A., J. (2010). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* on sensitive yeast and fungal pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3(1), 127–129. doi:10.1590/1678-4324-2017160339.

Pfeiffer, P. & Radler, F. (1982). Purification and Characterization of Extracellular and Intracellular Killer Toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Strain 28. *Journal of General Microbiology*, 128(1982), 2699–2706. doi:10.1099/00221287-128-11-2699

Podoliankaitė, M., Lukša, J., Vyšniauskis, G., Sereikaitė, J., Melvydas, V., Serva, S., Servienė E. (2014). High-yield expression in *Escherichia coli*, purification and application of budding yeast K2 killer protein. *Molecular Biotechnology*, 56(7): 644–652. doi:10.1007/s12033-014-9740-6

Polonelli, L., Conti, S., Campani, L., Gerloni, M., Morace, G. & Chezzi, C. (1991) Differential toxinogenesis in the genus *Pichia* detected by an anti-yeast killer toxin monoclonal antibody. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 139–145. doi:10.1007/BF00580653.

Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E. & Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155(2), 624–634. doi:10.1099/mic.0.023663-0

Santos, A., San Mauro, M. & Marquina, D. (2015). Killer yeasts as biological agents to

- control plant pathogenic fungi. *Biochemical Responses of Plants to Invaders*, 10(6), 79–96.
- Sawant, A. D., Abdelal, A. T. & Ahearn, D. G. (1989). Purification and Characterization of the Anti-*Candida* Toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(1), 48–52. doi: 10.1128/aac.33.1.48
- Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins : lethality and self-protection. *Nature Reviews*, 4(3), 212–221. doi: 10.1038/nrmicro1347
- Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x
- Schmitt, M. J. & Tipper, D. J. (1990). K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10(9):4807–4815, doi: 10.1128/mcb.10.9.4807.
- Schmitt, M. J. & Tipper, D. J. (1995). Sequence of the M28 dsRNA: Preprotoxin Is Processed to an α/β Heterodimeric Protein Toxin. *Virology*, 213(2), 341–351. doi:10.1006/viro.1995.0007
- Schaffrath, R., Meinhardt, F. & Klassen, R. (2018). Yeast Killer Toxins: Fundamentals and Applications. *Physiology and Genetics*, 87–118. doi:10.1007/978-3-319-71740-1_3
- Scherm, B., Ortu, G., Muzzu, A., Budroni, M., Arras, G. & Migheli, Q. (2003). Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology*. 85, 205–213. doi: 10.4454/jpp.v85i3.1032
- Segrest, J. P., Jackson, R. L., Andrews, E. P., & Marchesi, V. T. (1971). Human erythrocyte membrane glycoprotein: A re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(2), 390–395. doi:10.1016/0006-291x(71)90612-7
- Servienė, E., Čepononytė, S., Lebionka, A., Melvydas, V. (2007). Influence of Kex1p and Kex2p proteases on the function of *Saccharomyces cerevisiae* K2 preprotoxin. *Biologija*, 18(1):35-8.
- Somers, J. M. & Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetics Research*, 13, 71-83. doi: 10.1017/s0016672300002743
- Subramanian, S. & Ross, P. D. (1984). Dye-Ligand Affinity Chromatography: The Interaction of Cibacron Blue F3GA® with Proteins and Enzyme. *Critical Reviews in*

Biochemistry, 16(2), 169–205. doi:10.3109/10409238409102302

Suzuki, C. & Nikkuni, S. (1989). Purification and Properties of the Killer Toxin Produced by a Halotolerant Yeast, *Pichia farinosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2599–2604. doi:10.1080/00021369.1989.10869745

Suzuki, C. & Nikkuni, S. (1994). The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 304–316

Suzuki, C. & Shimma, Y. (1999). P-type ATPase *spf1* mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Molecular Microbiology*, 32(4), 813–823. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01400.x

Suzuki C. (2004). Acidophilic structure and killing mechanism of the *Pichia farinosa* killer toxin SMKT. 11, 189–214. doi: 10.1007/b101843

Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Lin, S., Yu, G. & Yang, S. (2018). Purification and molecular characterization of a *Metschnikowia saccharicola* killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 365(10). doi:10.1093/femsle/fny038

Taqarort, N., Echairi, A., Chaussod, R., Nouaim, R., Boubaker, H., Benaoumar, A. A. & Boudyach, E. (2008). Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 3031–3038. doi:10.1007/s11274-008-9849-5

Von Heijne G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research*, 14(11), 4683–4690. doi: 10.1093/nar/14.11.4683

Viljoen, B. C. (2006). Yeast Ecological Interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. *Yeasts in Food and Beverages*, 4, 83–110. doi:10.1007/978-3-540-28398-0_4

Wagner, A., Hetman, B., Kopacki, M., Jamiółkowska, A., Krawiec, P. & Lipa, T. (2013). Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. *Acta Agrobotanica*. 66. 77-88. doi: 10.5586/aa.2013.009.

Walker, G. M., Mcleod, A. H. & Hodgson, V. J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127(3), 213–222. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07476.x

- Wang, X. X., Chi, Z., Peng, Y., Wang, X. H., Ru, S. G. & Chi, Z. M. (2012). Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiological Research*, 167(9), 558–563. doi:10.1016/j.micres.2011.12.001
- Weiler, F., Rehfeldt, K., Bautz, F. & Schmitt, M. J. (2002). The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Mol Microbiol*, 46, 1095-105. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03225.x
- Weiler, F. & Schmitt, M. (2003). Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast , and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 69–76. doi:10.1016/s1567-1356(02)00126-5
- Wickner, R. B., Fujimura, T. & Esteban, R. (2013). Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycoviruses*, 86, 1–36. doi:10.1016/b978-0-12-394315-6.00001-5
- Woods, D. R. & Bevan, E. A. (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 51(1), 115–126. doi:10.1099/00221287-51-1-115
- Yap, N. A., de Barros Lopes, M., Langridge, P. & Henschke, P. A. (2000). The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 381–389. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01124.x
- Zhu, H. & Bussey, H. (1989). The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Applied and environmental microbiology*. 55(8), 2105-2107.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo magistro darbo vadovėms doc. dr. Jolantai Sereikaitei ir dr. Julianai Lukšai už pagalbą, kantrybę, pastabas, suteiktas žinias bei skirtą laiką. Taip pat norėčiau padėkoti doc. dr. Elenai Servienei už pasitikėjimą, palaikymą visų studijų laikotarpiu ir patarimus. Dėkoju Gamtos tyrimų centro Genetikos laboratorijos bei VGTU molekulinės biotechnologijos laboratorijos kolektyvams už draugiškumą ir pagalbą.

PRIEDAI

1 priedas. FEBS3+ 2019 konferencijos tezių knyga



63. ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* K2 TOXIN

Jovita Umbrasaitė¹, Juliana Lukša², Jolanta Sereikaitė², Elena Servienė^{1,2}

¹Vilnius Gediminas Technical University, Vilnius, Lithuania

²Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania

Killer yeasts secrete toxins lethal to sensitive yeasts but are immune to their own toxins. *S. cerevisiae* produces nuclear-encoded killer toxins KHS, KHR and double-stranded RNA virus-encoded killer toxins K1, K2, K28, and Klus. Killer proteins have been diverse in their chemical and physical properties and can be used as a model system for investigating the mechanisms of maturation, secretion and interaction of toxin with sensitive cells or applied to medical, environmental and industrial biotechnology. In order to use toxins in various fields and be able to characterize their function, structure or interactions, it is important to obtain pure and active protein.

In this study *S. cerevisiae* K2 toxin-producing strain was grown at the optimal toxin-producing condition, the extracellular fraction was filtered through a 0.22 µm polyvinylidene fluoride membrane and concentrated by ultrafiltration through an Amicon PM-10 membrane. Then, the sample was applied onto the SP Sepharose column in 50 mM acetate buffer (pH 4.2) and bound toxin was eluted by applying a linear gradient of 0-0.4 M NaCl. The collected fractions were applied for PAGE analysis and measured for toxin activity. It was determined that partially purified K2 toxin displayed maximum killer activity between pH 4.0 and 4.4. The protein was stable between pH 2.5 and 4.5 and inactivated at temperatures above 45°C. To increase the yield and quality of K2 toxin, determine protein structure additional purification steps are required.

3 priedas. FEBS3+ konferencijas dalvyio pažymėjimas



SUTIKIMAS DĖL ASMENS DUOMENŲ NAUDOJIMO

2020 05 21

(Data)

Šiuo sutikimu aš, Jovita Umbrasaitė, (toliau – Duomenų subjektas) sutinku, kad Vilniaus Gedimino technikos universitetas, juridinio asmens kodas 111950243, adresas Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius (toliau – Duomenų valdytojas), tvarkytų mano asmens duomenis kitų studentų mokymosi tikslu. T. y. tvarkytų *(pažymėkite tinkamą)*:

- ☐ vardą, pavardę, bakalauro baigiamąjį darbą;
- ☐ bakalauro baigiamąjį darbą, nenurodant vardo, pavardės;
- ☒ vardą, pavardę, magistro baigiamąjį darbą;
- ☐ magistro baigiamąjį darbą nenurodant vardo, pavardės.

Šiuo tikslu tvarkomų asmens duomenų Duomenų valdytojas neperduos jokiems tretiesiems asmenims, studentams su baigiamaisiais darbais bus leidžiama susipažinti vidinėje informacinėje sistemoje. Duomenų subjekto asmens duomenys šiuo tikslu bus naudojami ne ilgiau nei 5 metai.

Šiuo sutikimu Duomenų subjektas patvirtina, kad yra supažindintas su šiomis teisėmis:

- Susipažinti su savo duomenimis ir kaip jie yra tvarkomi (teisė susipažinti);
- Reikalauti ištaisyti arba, atsižvelgiant į asmens duomenų tvarkymo tikslus papildyti asmens neišsamius asmens duomenis (teisė ištaisyti);
- Savo duomenis sunaikinti arba sustabdyti savo duomenų tvarkymo veiksmus (išskyrus saugojimą) (teisė sunaikinti ir teisė „būti pamirštam“);
- Reikalauti, kad asmens duomenų valdytojas apribotų asmens duomenų tvarkymą (teisė apriboti);
- Teisė į duomenų perkėlimą (teisė perkelti);
- Nesutikti, kad būtų tvarkomi asmens duomenys, kai šie duomenys tvarkomi ar ketinami tvarkyti kitais tikslais;
- Pateikti skundą Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai;

Duomenų subjektas turi teisę bet kuriuo metu atšaukti savo sutikimą.

Jovita Umbrasaitė

[Duomenų subjekto vardas, pavardė, parašas]

Duomenų valdytojo rekvizitai:
Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Juridinio asmens kodas: 111950243
Adresas: Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius
Tel. (8 5) 274 5030
Faks. (8 5) 270 0112
El. paštas: vgtu@vgtu.lt
PVM mokėtojo kodas: LT119502413
Duomenų apsaugos pareigūno tel. (8 5) 251 2191, el. paštas: dap@vgtu.lt