

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA PRIONA U EVOLUCIJI KVASACA

THE SIGNIFICANCE OF PRIONS IN YEAST
EVOLUTION

SEMINARSKI RAD

Nina Čorak
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Dijana Škorić

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. MEHANIZAM PROPAGACIJE PRIONA NJIHOVO JE DETERMINIRAJUĆE SVOJSTVO.....	3
3. GENETIČKA POZADINA FORMIRANJA PRIONA.....	4
4. DISTRIBUCIJA POTENCIJALNIH PRION-FORMIRAJUĆIH DOMENA UNUTAR KRALJEVSTVA FUNGI.....	5
5. RAZNOLIKOST PRIONA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
6. PRIMJERI EVOLUCIJSKI POTENCIJALNO ZNAČAJNIH PRIONSKIH MEHANIZAMA.....	8
6.1.[PSI ⁺] dovodi do ekspresije kriptičke genetičke varijabilnosti kod vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
6.2.[MOT3 ⁺] - molekularni prekidač ovisan o uvjetima okoliša.....	10
6.3.[GAR ⁺] - posljedica simbiotskih odnosa u mikrobiomu groždanog soka.....	12
6.4.Prioni kao uzročnici heterokarionske inkompatibilnosti kog gljivice <i>Podospora anserina</i>	14
7. ABIOTIČKA EVOLUCIJA I PRIONI U EKSTREMNIM UVJETIMA.....	15
8. JESU LI PRIONI PASIVNI ENTITETI ZAHVAĆENI EVOLUCIJOM ILI AKTIVNO SUDJELUJU U FORMIRANJU EVOLUCIJSKIH PROCESA?	17
9. ZAKLJUČAK.....	19
10. LITERATURA.....	22
11. SAŽETAK.....	24
12. SUMMARY.....	23

1. UVOD

Jednostanična gljivica *Saccharomyces cerevisiae* (F.Meyen et E.C. Hansen) ili pekarski kvasac od najranijih je početaka civilizacije organizam od iznimnog značenja. Prvotno se koristi u procesu alkoholnog vrenja u svrhu proizvodnje piva i vina, te dizanja tijesta. S razvojem tehnologije kvasac se pokazuje pogodan za mnoge nove oblike upotrebe (Feldmann 2010). Jedan od njih je i proizvodnja ekološki prihvatljivog goriva - bioetanola. Brazil, kao vodeća zemlja u ovoj djelatnosti godišnje proizvede oko 15 milijardi litara bioetanola, a 40% vozila u Brazilu koristi smjesu benzina i etanola sa dvadesetpsototnim volumnim udjelom bioetanola. Uzimajući u obzir ove podatke, nije iznenađujuće da je upravo kvasac jedan od najbolje istraženih eukariota danas. Ipak, najveći potencijal kvasac ostvaruje kao modelni organizam u molekularnoj biologiji i biokemiji (Feldmann 2010).

Za razliku od odavno poznatog i dobro istraženog pekarskog kvasaca, ideja o prionima kao o molekularnim parazitima isključivo proteinske građe javlja se 60-ih godina prošlog stoljeća kada je ponuđena kao rješenje za pojavu prijenosnih oblika spongioformnih encefalopatija. Mehanizam propagacije i prirodu priona pobliže je opisao Stanley B. Prusiner 1982. godine (Liberski 2012). Od tada su prioni uglavnom promatrani u svjetlu njihovog patogenog neurodegenerativnog učinka kod sisavaca. Prionske bolesti poput Creutzfeldt-Jakobove bolesti, kuru-sindroma i Gerstmann–Sträussler–Scheinker-sindroma kod ljudi te scrapie-bolesti kod ovaca neizlječivi su poremećaji koji sporo napreduju i teško se istražuju (Liberski 2012). Pritom su potrebni izrazito strogo kontrolirani laboratorijski uvjeti te i danas postoji mali broj laboratorija koji se bavi prionima sisavaca (Liberski 2012).

Kada su Wickner i suradnici 1994. godine otkrili da su citoplazmatski čimbenici nasljeđivanja vrste *Saccharomyces cerevisiae* - [PSI⁺] i [URE⁺], po svojoj prirodi prioni, započinje nova faza istraživanja ovog fenomena (Grossniklaus et al. 2013). Kvasci su relativno jednostavni organizmi, s kratkim generacijskim vremenom, kojima je lako manipulirati i koji su pogodni za uzgoj u laboratorijskim uvjetima. Pored toga nisu patogeni, lako prelaze iz jednostaničnih oblika u strukture nalik biofilmovima, a razmnožavaju se spolno i nespolno (Feldmann 2010). Zahvaljujući ovim obilježjima kvasci su danas vodeći modelni organizmi u istraživanju bazične biologije priona, a u ovom seminaru ću upravo na primjeru kvasaca pokušati objasniti potencijalnu ulogu priona kao evolucijskih čimbenika.

2. MEHANIZAM PROPAGACIJE PRIONA NJIHOVO JE DETERMINIRAJUĆE SVOJSTVO

Prioni su izoforme proteina koje se zbog svojih konformacijskih obilježja mogu prenositi s jedne stanice na drugu, a da pritom djeluju u smjeru povećanja svoje koncentracije. Prenose se među stanicama pupanjem, spolnim i nespolnim razmnožavanjem, a njihovo formiranje moguće je potaknuti laboratorijskim tehnikama kao što su izlaganje stanica visokim koncentracijama etanola ili povišenim temperaturama (Heather et al. 2000, An et al. 2016). Kako su prioni i pripadajuće native konformacije proteina identični po aminokiselinskom slijedu, a različiti s obzirom na konformaciju, važno je razjasniti molekularni mehanizam njihovog umnažanja tj. propagacije (An et al. 2016).

Prioni često tvore hidrofobne, nitaste agregate nazvane amiloidna vlakna u čijoj sekundarnoj strukturi prevladavaju β -nabrane ploče. Ukoliko se nalaze na površini proteina koja je u dodiru s citoplazmom, β -ploče imaju mogućnost da proteine s uobičajenom konformacijom mijenjaju na način da njihove α -uzvojnice poprimaju formu β -nabranih ploča tj. prionsku konformaciju (Slika 2.a i Slika 2.c). Ovaj neobičan način propagiranja jedinstvena je značajka priona (An et al. 2016). Međutim, prionska konformacija je metastabilna i lako prelazi iz [PRION⁺]-fenotipa u [prion⁻]-fenotip što je osnovni mehanizam gubitka priona (Crow et al. 2011)

Sup35 je protein koji nalazimo kod vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Kad je u prionskoj formi očituje se kao [PSI⁺]-fenotip. Stabilnost Sup35 priona je temperaturno ovisna na način da je prion stabilniji pri nižim nego pri višim temperaturama. Zanimljivo je da manje stabilni prioni uzrokuju jači [PSI⁺]-fenotip što se može objasniti time da u uvjetima povišene temperature nastaje više prionskih centara koji u kvaščevim potomcima mogu ubrzati stvaranje prionskog fenotipa (Frederick et al. 2014).

U ovom procesu kritičnu ulogu ima evolucijski visoko konzervirani šaperon Hsp104 koji je ključan za uspješno rasprostranjivanje priona. Naime, Hsp104 odvaja pojedinačne proteine iz amiloidnog vlakna stvarajući na taj način nove centre nukleacije priona. Ti centri se putem citoplazme prenose na novu jedinku tijekom diobe stanice. Hsp104 može djelovati u smjeru poticanja formiranja ili razgradnje amiloidnog vlakna što prvenstveno ovisi o njegovoj koncentraciji u stanici. Ukoliko je koncentracija Hsp104 niža od uobičajene, Hsp104 ne odvaja pione iz amiloidnog vlakna tako da oni ne mogu služiti kao novi centri nukleacije.

Ukoliko je koncentracija Hsp104 viša nego što nalazimo prilikom njegove bazične ekspresije, amiloidno vlakno neće se moći formirati jer će brzina njegove razgradnje biti veća nego brzina njegove izgradnje. Jedino bazična ekspresija Hsp104 osigurava postojanje amiloidnog vlakna i stvaranje novih centara nukleacije (Romanova et al. 2009).

Ovo je način na koji prioni djeluju kao epigenetički elementi, podložni selekciji na molekularnoj razini. Naime, one će prionske izoforme koje imaju veći potencijal za propagaciju i indukciju prionskog namatanja bit će uspješnije prenesene na potomstvo (Romanova et al. 2009).

3. GENETIČKA POZADINA FORMIRANJA PRIONA

Danas je pomoću raznovrsnih računalnih programa moguće pretraživati baze podataka u potrazi za genima koji kodiraju proteine koji bi mogli imati prionska obilježja. Većina ih je spoj algoritama koji predviđaju vjerojatnost da će neki aminokiselinski slijed poprimiti prionsku konformaciju (npr. PrionW i PLAAC), te klasičnih alata za pretraživanje sljedova (npr. Protein BLAST). Također se mogu koristiti baze kao što je PrionHome database (An et al. 2016).

Kako teorijski tako i eksperimentalno, dokazano je da u većini slučajeva sam slijed nema značajnog utjecaja na mogućnost formiranja priona, već udio asparagina (N) i glutamina (Q) u tom slijedu. Veći udio navedenih aminokiselina olakšava tvorbu priona. Ovo svojstvo, doprinosi lakšem prijenosu priona između raznih taksona. Tako prion CPEB kalifornijskog morskog zekana *Aplysia californica* (J.G.Cooper) može inducirati nastanak priona u *Saccharomyces cerevisiae* (An et al. 2016). Unatoč tome, prioni se u pravilu teško prenose čak i među bliskim vrstama kao što su *Saccharomyces bayanus* (P.A. Saccardo) i *Saccharomyces paradoxus* (A.A. Bachinskaya). Ova barijera uglavnom je posljedica razlike u aminokiselinskom slijedu kod proteina koji mogu promijeniti konformaciju pri kontaktu s prionom (Sharma et al. 2016).

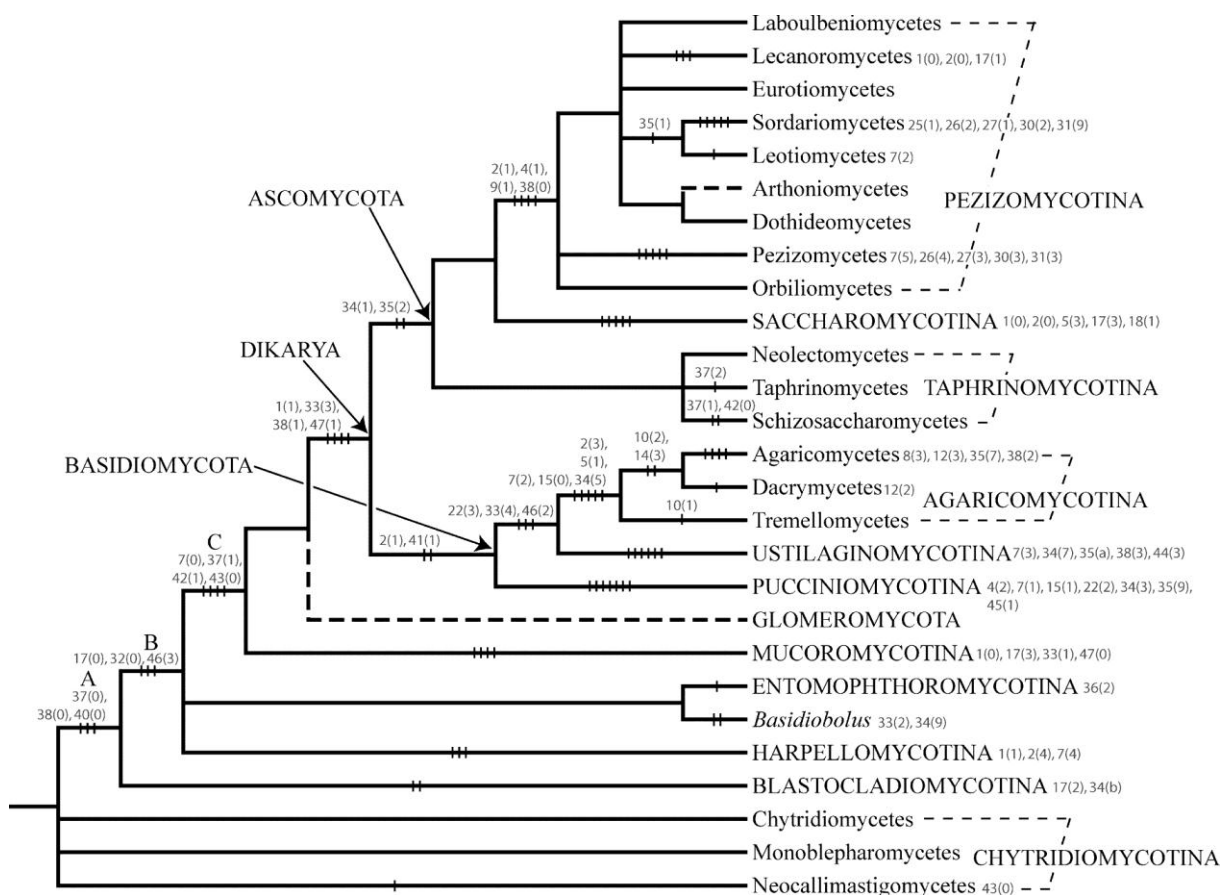
Uspoređivanjem sljedova gena koji kodiraju za hipotetske prione moguće je pratiti kada se u evoluciji javljaju geni koji kodiraju za potencijalne prion formirajuće proteine. Eksperimentalno je potvrđeno da neki od tih gena uistinu formiraju prione (An et al. 2016) ili češće, da je svega mala promjena sekvence za to dovoljna (Wickner et al. 2016).

4. DISTRIBUCIJA POTENCIJALNIH PRION-FORMIRAJUĆIH DOMENA UNUTAR KRALJEVSTVA FUNGI

N-bogate prione nalazimo unutar razreda *Saccharomycetes* koji se od ostalih razreda unutar carstva Fungi odvojio nakon cjelovite duplikacije genoma prije 100 milijuna godina. Q-bogate prione nalazimo podjednako u cijelom carstvu. Poticanjem opće mutageneze eksperimentalno je pokazano da su mnogi sljedovi *Saccharomyces cerevisiae* sposobni uz veoma male varijacije u nukleotidnoj sekvenci izražavati prionski fenotip, tj. da *Saccharomyces cerevisiae* ima veoma očuvan potencijal formiranja priona (An et al. 2016).

Redovi Eurotiales, Schizosaccharomycetales i cijeli razred Agaricomycetes, koji obuhvaća više gljive, imaju mnogo manje N/Q-bogatih proteina (Slika 1.). Općenito možemo reći da su N-bogati proteini obilnije zastupljeni u genomima gljiva od Q-bogatih proteina. Razlog za ovakvu distribuciju gena vjerojatno je tendencija Q-bogatih proteina da tvore neobične, toksične izoforme koje ne agregiraju, ali su sposobne promijeniti konformaciju proteina iz funkcionalne u prionsku. Nasuprot tome, N-bogati proteini češće tvore benigna amiloidna vlakna (An et al. 2016). Možda su zbog snažnije izraženog negativnog efekta Q-bogati proteini bili izloženi jačem selektivnom pritisku u smjeru smanjenja afiniteta nukleotidnog slijeda da kodira potencijalne prionske izoforme.

Najveći udio N/Q bogatih proteina koji potencijalno formiraju prione nalazimo kod rodova *Candida* i *Tetrapisispora*, te kod vrsta *Saccharomyces dairenensis* (H.Nagan) i *Lodderomyces elongisporus* (R. Van der Walt et M. Van der Walt) kod kojih nalazimo do 400 takvih potencijalno prionskih domena (An et al. 2016).



Slika 1. Kladogram srodstvenih odnosa unutar kraljevstva Fungi. U sklopu seminara promatrane su samo vrste pripadnici taksonomske jedinice Dikarya (više gljive) kojima je zajedničko obilježje nedostatak biča kod spolnih stanica (preuzeto od Celio et al. 2006).

5. RAZNOLIKOST PRIONA KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Svi prioni kvasca posjeduju N/Q-bogatu prionsku domenu nužnu za njihovu propagaciju. Međusobno se razlikuju se po fenotipskom učinku, ali i po mogućnosti da se taj učinak neutralizira dodatkom gvanidin-hidroklorida ili promjenom koncentracije Hsp104 u citoplazmi. U većini slučajeva delecija gena koji kodira prion uzrokuje gubitak prionskog fenotipa. Događa se i da prion kodiran vlastitim nukleotidnim slijedom može inducirati formiranje drugog priona iz proteina s različitim funkcijom i aminokiselinskim slijedom nego što ga ima prvi prion (Crow et al. 2011).

[URE3⁺] jedan je od najranije opisanih prionskih fenotipova. Protein Ure2 transkripcijski je aktivator gena koji kodiraju za faktore čija je funkcija sprječavanje upotrebe dušikom siromašnih spojeva u prisutnosti onih koji su dušikom bogati. Zbog poremećaja funkcije ovog proteina kao što je smanjenje njegove efikasne koncentracije zbog vezanja u agregate, [URE3⁺] stanice iskorištavaju siromašne izvore dušika čak i u prisutnosti dušikom bogatih spojeva kao što je amonijak (Crow et al 2011) .

Kada Rnq1, protein nepoznate uloge, poprimi svoju prionsku formu stanice postaju [PIN⁺]. Mehanizam djelovanja ovog priona je nepoznat, no utvrđena je korelacija između prisutnosti ovog priona u citoplazmi i formiranja [PSI⁺]-fenotipa kod *Saccharomyces cerevisiae* (Crow et al. 2011).

[SWI⁺]-fenotip uzrokuje prionska forma proteina Swi1 koji je sastavni dio kompleksa za remodeliranje kromatina. Nativna forma ovog proteina djeluje u jezgri. Unatoč tome, prionski se agregati formiraju u citoplazmi. Fenotipski efekt se očituje kao smanjena mogućnost rasta na podlogama u kojima primarni izvor ugljika nije glukoza. (Crow et al. 2011).

Protein Sfp1 je transkripcijski regulator koji utječe na ekspresiju čak 10% ukupnih gena kvasca. Njegova funkcija je kontrola staničnog ciklusa, rasta stanice i pupanja. Poprimanje prionske konformacije dovodi do [ISP⁺]-fenotipa koji se očituje kroz supstituciju besmislenih mutacija. Ovaj prion tvori agregate u jezgri i zbog toga prijenos priona citokondukcijom pokazuje malu učinkovitost (Crow et al. 2011).

Osim ovih, *Saccharomyces cerevisiae* može sadržavati niz drugih prionskih bjelančevina koje uzrokuju [PSI⁺], [OCT⁺], [MOT3⁺], [MCA⁺], [GAR⁺] i najnovije otkriven [NSI⁺]-fenotip. Pojedini od njih biti će detaljno objašnjeni, skupa s mehanizmima njihovog djelovanja (Crow et al. 2011).

6. PRIMJERI EVOLUCIJSKI POTENCIJALNO ZNAČAJNIH PRIONSKIH MEHANIZAMA

6.1. [PSI⁺] dovodi do ekspresije kriptičke genetičke varijabilnosti kod *Saccharomyces cerevisiae*

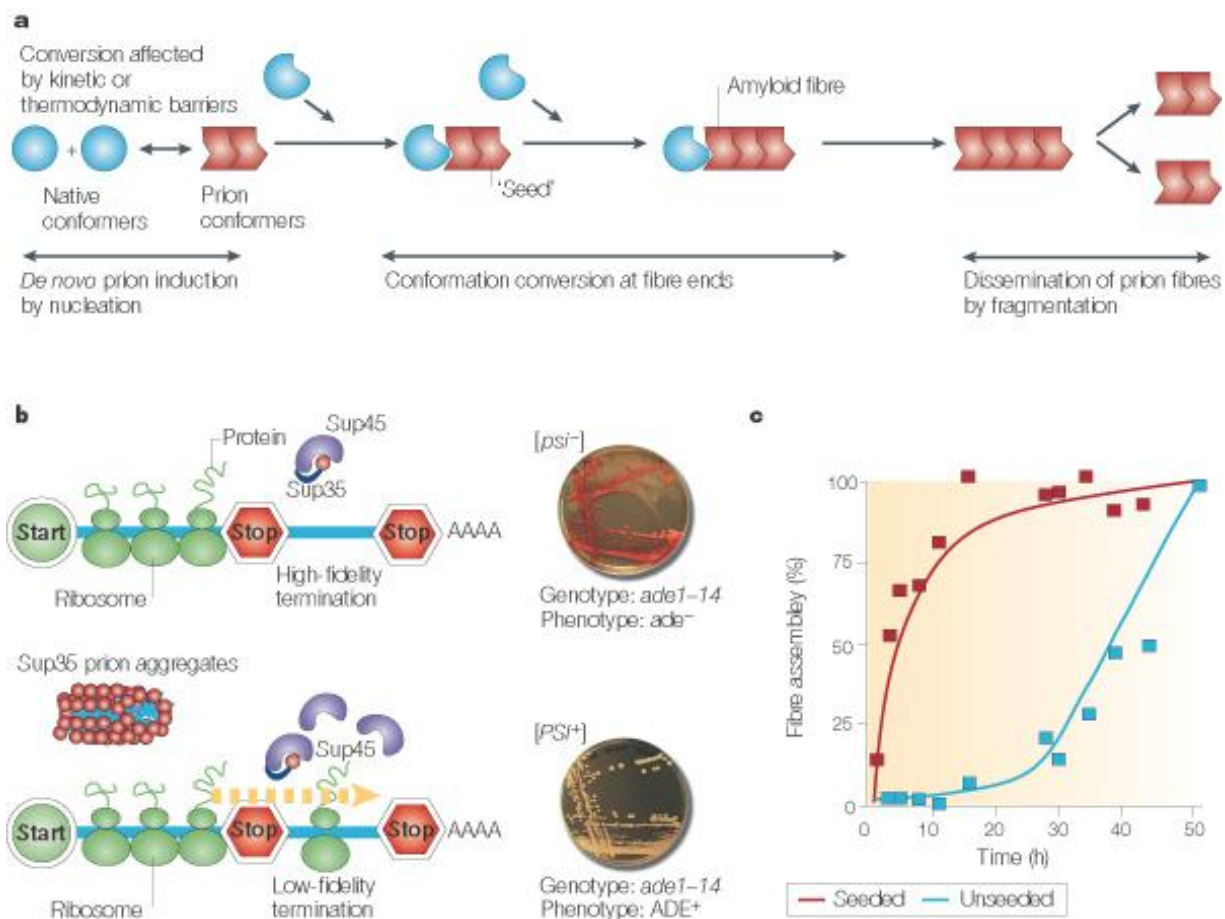
Sup35 jedan je od faktora koji sudjeluje u terminaciji translacije. Dok Sup45 prepoznaje stop-kodon, Sup35 pomaže u otpuštanju polipeptidnog lanca uz hidrolizu GTP-a. Nalazimo ga kod vrste *Saccharomyces cerevisiae* (An et al. 2016).

Ovaj protein relativno često poprima prionsku konformaciju rezultirajući [PSI⁺] fenotipom u kvasca. U ovim uvjetima smanjuje se djelotvorna količina Sup35 proteina jer se većina proteina veže u amiloidna vlakna (Slika 2. b). To uzrokuje povećanje stope prolaska kroz stop-kodon pa sintetizirani polipeptidi imaju produžetke na karboksilnom kraju (Heather et al. 2000).

S. Lindquist i suradnici otkrili su da raznoliki sojevi kvasaca pri različitim stresnim uvjetima pokazuju različitu stopu preživljavanja ovisno o tome radi li se o [PSI⁺] ili [psi⁻] fenotipu. Ono što je iznenađujuće je da su u nekim slučajevima [PSI⁺] kolonije kvasaca pokazale veću stopu preživljenja, što je suprotno dotadašnjem mišljenju da su prioni isključivo infektivni uzročnici koji smanjuju vijabilnost jedinke (Heather et al. 2000).

Na ovaj način dolazi do ekspresije kriptičke genetičke varijabilnosti u stresnim uvjetima jer se transliraju regije na 3'-kraju mRNA koji ne tvore peptidne sljedove ukoliko stanica ne izražava [PSI⁺]-fenotip. Ukoliko takve regije na 3'-kraju mutiraju, u normalnim okolnostima nema ekspresije i mutacije se kroz vrijeme mogu akumulirati. Kada se jednom takav segment eksprimira on je bitno promijenjen u odnosu na izvorni (Heather et al. 2000).

Postavlja se pitanje može li ovakav proces ubrzati i potaknuti specijaciju. Mnogi matematički modeli predlažu da ovaj tip regulacije nije slučajna proces te da se njime ubrzava evolucija unutar ove skupine (Masel et al. 2003). Također, evolucijske su analize pokazale da je N/Q-slijed priona odgovornih za [PSI⁺] fenotip očuvan u kraljevstvu gljiva te da je unutar njega divergirao prije milijardu godina (An et al. 2016).



Slika 2. a) Proces nukleacije, tj. formiranja priona *de novo* je proces koji je rijedak, a njegova učestalost ovisi prvenstveno o kinetičkim i termodinamičkim obilježjima citosola stanice. Kad se jednom takav prion formira on djeluje na nesmotane proteine na način da pasivno usmjerava njihovo namatanje u smjeru nastanka priona. Takvi prioni tvore agregate. Propagacija priona se postiže degradacijom agregata jer se povećava aktivna površina djelovanja prionskih molekula. **b)** Kod *Saccharomyces cerevisiae*, prilikom nastanka besmislene mutacije u genima odgovornim za sintezu adenina dolazi do dva efekta. Jedan je nemogućnost rasta na podlogama koje ne sadržavaju dodani adenin, a druga je taloženje crvenog pigmenta. Sup45 i Sup35 sudjeluju u terminaciji translacije. Kada je Sup35 vezan u amiloidna vlakna nije u mogućnosti terminirati translaciju prilikom detekcije stop kodona. Zbog toga [PSI⁺] suprimira besmislenu mutaciju i kolonije su bijele boje. **c)** Dinamika formiranja prionskih agregata ovisi tome pratimo li razvitak priona *de novo* ili su u stanice prethodno unesene male količine agregata. Ukoliko u stanici prije početka praćenja nije bilo priona krivulja rasta ima karakterističnu log fazu (plava krivulja). U suprotnom, log faza izostaje (crvena krivulja). Ukupan broj prionskih molekula u stanici (N) možemo približno opisati formulom $N = n_0 \cdot 2^B$, gdje n_0 predstavlja početni broj prionskih molekula, a B broj ciklusa u kojem dolazi do konformacijske promjene proteina. Iako je ova formula približno dostatna da se opiše razliku vidljivu na grafu, treba imati na umu da je prionska kinetika mnogo složenija jer je B veoma ovisan o citoplazmatskom okolišu, broj 2 koji potenciramo može poprimiti i manju vrijednost što ovisi o dinamici formiranja i razgradnje agregata, ali i o međuproteinskim reakcijama i tipu priona (preuzeto od Shortet et al. 2005.).

6.2. [MOT3⁺] - molekularni prekidač ovisan o uvjetima okoliša

D. L. Holmes i suradnici proveli su istraživanje u kojem su definirali gene pod kontrolom prion-formirajućih transkripcijskih faktora Cyc8, Mot3, Sfp1 i Gln3 koji posjeduju sposobnost formiranja priona kod vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Geni koji odgovaraju toj funkciji su *flo11*, regulator ekspresije membranskih glikoproteina, te *hxt2* čiji je proteinski produkt visokoafinitetni glukoзни transporter. Oba gena se aktiviraju u uvjetima stresa kada reguliraju međustaničnu adheziju i komunikaciju te metabolizam. Također, *flo11* je reguliran s kromatin-remodelirajućim faktorom Swi1 koji također ima mogućnost poprimanja prionske konformacije. Vjerojatnost da bilo koji ORF bude reguliran jednim od ovih prion formirajućih transkripcijskih faktora procijenjena je na $1,213 \cdot 10^{-5}$ čime se odbacuje mogućnost da su ovi rezultati produkt slučajnosti (Holmes et al. 2013).

Saccharomyces je rod koji ima dobro razvijen mehanizam prelaska iz jednostaničnog u višestanični stadij i obratno. Ovisno o tipu hranidbene podloge primijećene su mnoge morfološke inačice građe kolonija, primjerice grudasti oblici, lančaste strukture i biofilmovi. Neki od kolonijalnih oblika čak su sposobni prodrijeti u supstrat prilikom izlaganja siromašnim izvorima dušika (Masel et al. 2003, Koschwanez et al. 2011, Holmes et al. 2013). Adhezini koji povezuju stanice u ovom procesu jedni su od proteina s najkompleksnijom mrežom regulacije i stopom evolucije, a jedan od ključnih gena u regulaciji njihove ekspresije je *flo11* (Holmes et al. 2013.). U tom kontekstu ekspresija *flo11* potiče stvaranje kolonijalnih oblika sposobnih koristiti alternativne izvore ugljika i dušika (Hope et al. 2014.).

U uvjetima kada stanica raste na ugljikom bogatom mediju protein Mot3 u svojoj nativnoj konformaciji djeluje kao represor gena *flo11* ali i ostalih gena koji sudjeluju u preinaci plazma membrane kvasca (Masel et al. 2003). Kada protein prijeđe iz svoje native u prionsku formu često tvori amiloidna vlakna. Takav protein u stanici nije funkcionalan zbog smanjene topljivosti što dovodi do zaključka da do ekspresije gena *flo11* dolazi zbog niske djelotvorne koncentracije proteina Mot3 u stanici. Unatoč tome, delecija gena *mot3* i induciranje prionske forme proteina Mot3 ne daju isti fenotip (Holmes et al. 2013.). Mot3 se na operatorsko mjesto veže kao sastavni dio kompleksa koji osim Mot3 čini i specifični korepresor. Prilikom tvorbe agregata prion Mot3 u agregat veže i molekulu korepresora, dok se prilikom deletiranja gena *mot3* korepresor tek djelomično veže na operator uzrokujući smanjenu stopu sinteze proteina (Alberti et al. 2009). Mot3 također regulira mnoge

transportaze predviđene za transport šećera i enzime koji sudjeluju u biosintezi sterola (Holmes et al. 2013).

Utjecaj priona Mot3 na adheziju stanica *Saccharomyces cerevisiae* potvrđena je pokusom gdje su dvije grupe stanica fenotipa [MOT3⁺] i [mot3⁻] uzgajane na podlozi koja je kao jedini izvor dušika sadržavala prolin. Prolin je siromašan izvor dušika za *Saccharomyces cerevisiae*. Nakon 5 dana kolonije [mot3⁻] su se jednostavno mogle ukloniti ispiranjem pomoću mlaza vode. Suprotno tome, stanice [MOT3⁺] nisu se mogle dislocirati zbog toga što su neke od njih diferencirale u filamente kojima su kolonije bile vezane za podlogu. (Holmes et al. 2013.)

Dvije grupe stanica istog soja kao i stanice iz prethodnog primjera, [MOT3⁺] i [mot3⁻], testirane su na podlogama koje kao izvor ugljika koriste glukozu, galaktozu, glicerol i etanol. Kolonije s fenotipom [mot3⁻] na svim podlogama, te kolonije sa [MOT3⁺] fenotipom koje su se razvijale na glukozu i galaktozu tvorile su jednostavne, glatke kolonije. Nasuprot tome, kolonije fenotipa [MOT3⁺] koje su kao izvor ugljika koristile glicerol i etanol činile su strukturu koja je morfološki podsjećala na biofilm (Holmes et al. 2013)

Prion koji uzrokuje fenotip [MOT3⁺] pronađen je kod 6 divljih sojeva kvasaca (Heather et al. 2000, Holmes et al. 2013, An et al. 2016). U eksperimentu gdje je kemijskim metodama potaknut izražaj prionskog fenotipa otkriveno je da 40% svih ovakvih fenotipova može rezultirati selektivnom prednošću ovisno o okolišnim uvjetima kao što su niski pH, prisutnost antifungicida i visoka koncentracija etanola (Heather et al. 2000).

Ovo ide u prilog matematičkom modelu koji je predložen 2001. godine koji predlaže da se višestaničnost razvila iz kompeticije mehanizama za sintezu ATP-a na osnovu izvora ugljika (Pfeiffer et al. 2001). S obzirom na značaj konformacije koju poprima protein Mot3 u definiranju tipa interakcije među stanicama *Saccharomyces cerevisiae* ovisno o izvoru ugljika, ostaje neriješeno ima li prionska domena protein Mot3 proteina specifični prekidač ovisan o stresnim uvjetima i možemo li ovu pretpostavku primijeniti na prione generalno (Holmes et al. 2013.).

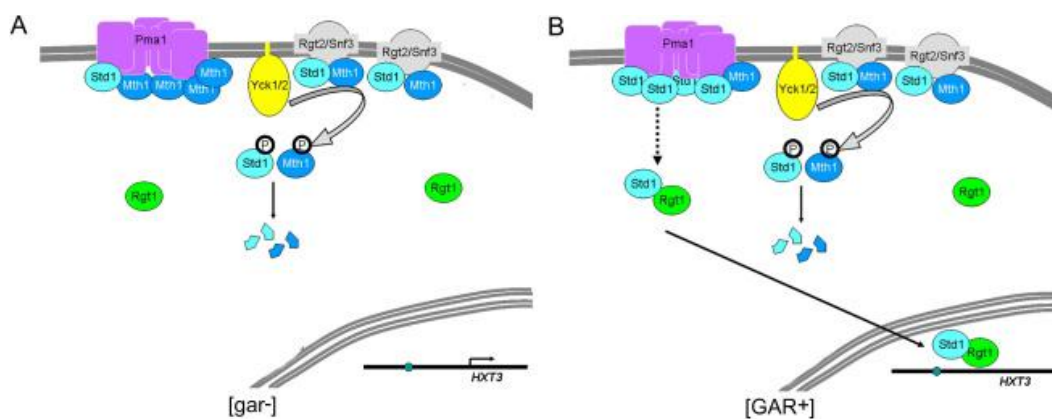
6.3. [GAR⁺] - posljedica simbiotskih odnosa u mikrobiomu groždanog soka

U nekim slučajevima tekuće kulture *Saccharomyces cerevisiae* u kojima se koristi glukoza kao izvor ugljika te se odvija alkoholno vrenje, mijenjaju ponašanje na način da kao primarni izvor ugljika koriste etanol koji su same sintetizirale i koji se zbog toga nalazi u mediju. Ovo je fenomen koji objašnjava zastoje fermentacije, a poznat je u vinogradarstvu. Naime, kada vinski kvasci pretežito koriste etanol kao izvor ugljika dolazi do smanjenja razine etanola, a pored toga u vinu nalazimo više glukoze za rast bakterija koje ju metaboliziraju te mijenjaju okus vina smanjujući mu kvalitetu i uzrokujući brže kvarenje. Iz tog je razloga među vinarima raširena praksa dodavanja sumporovog dioksida u groždani sok jer sumporov dioksid toksičan za većinu bakterijskih vrsta (Walker et al. 2016).

L. Bisson i suradnici istražili su uzroke promjena biokemijskih obrazaca u stanici kvasca tijekom alkoholne fermentacije. Rezultati su pokazali da bakterijske populacije koje uzrokuju kvarenje vina potiču poprimanje prionske forme proteina Std1 i Pma1 koji uzrokuju fenotip [GAR⁺] kod *Saccharomyces cerevisiae* soja UCD932 (Walker et al. 2016).

Preferiranje glukoze ispred etanola, kod kvasca je regulirano represijom gena *hxt3* koji kodira za heksozni transporter malog afiniteta za glukozu i fruktozu (Guillaume et al. 2007, Brown et al. 2009). Ekspresija *hxt3* primarno je kontrolirana putem *Snf3/Rgt2* u kojem kompleks *Snf3/Rgt2* čini transmembranski senzor za glukozu (Slika 3.a). U prisutnosti glukoze *Snf3/Rgt2* kaskadnim prijenosom signala uzrokuju fosforilaciju Std1 obilježavajući ga za razgradnju. U uvjetima nedostatka glukoze Std1 se veže sa *Rgt1* i *Mth1* tvoreći inhibitor što omogućuje upotrebu alternativnih izvora ugljika kao što su etanol ili glicerol (Brown et al. 2009).

Međutim, iako prioni često imaju isti fenotipski efekt kao i delecija gena koji taj prion kodiraju, delecija *std1* kod kvasaca poteklih od fenotipa [gar⁻] ne daje kolonije koje su sposobne koristiti glicerol kao izvor ugljika u prisutnosti glukoznog analoga. Unatoč tome, kulture s deletiranim genom *std1* potekli od jedinki s fenotipom [GAR⁺] su sposobne rasti na podlozi s glicerolom. Biokemijskim je metodama pak pokazano da je jedini protein koji se veže na Std1 u [GAR⁺] a ne u [gar⁻] velika ATP-aza Pma1 koja pumpanjem vodikovih iona regulira stanični pH. Pma1 koji je jedan od najzastupljenijih membranskih proteina u kvasaca veže Std1 represor (Slika 3.b). Prilikom poprimanja prionskog oblika Pma1 ima smanjen kapacitet vezanja Std1 te može doći do formiranja represorskog kompleksa koji sprečava sintezu Hxp3 (Brown et al. 2009.).



Slika 3. Snf3/Rgt2 signalni put vrste *Saccharomyces cerevisiae*. **a)** U stanici [gar⁻]-fenotipa, transmembranski senzor za glukozu Snf3/Rgt2 potiče fosforilaciju proteina Std1 te onemogućuje tvorbu represorskog kompleksa *hxt*. **b)** Kod stanica [GAR³⁺]-fenotipa, transmembranska ATP-aza Pma1 poprima prionsku konformaciju. Zbog toga što je ATP-aza Pma1 obilno zastupljena u stanici u takvim uvjetima dolazi do oslobađanja velike koncentracije proteina Std1 koji tvori represorski kompleks te ne dolazi do transkripcije gena *hxt3* (preuzeto od Brown et al. 2009.).

Ovaj tip simbioze koristan je i po bakterijsku populaciju i po *Saccharomyces cerevisiae*, a na sličan se način ponašaju i vrste *S. paradoxus* i *S. bayanus* čiji je najmlađi zajednički predak sa *S. cerevisiae* star oko 5 milijuna godina (Brown et al. 2009). Dok kvasci na ovaj način proširuju spektar raznih izvora ugljika, bakterijama pogoduje okoliš s manjom količinom etanola kao i povećana koncentracija glukoze koju upotrebljavaju za dobivanje energije i anaboličke procese. Prionski fenotip kod kvasca stoga produžuje životni vijek mikrobioma koji nalazimo u fermentirajućem grožđanom soku (Walker et al. 2016).

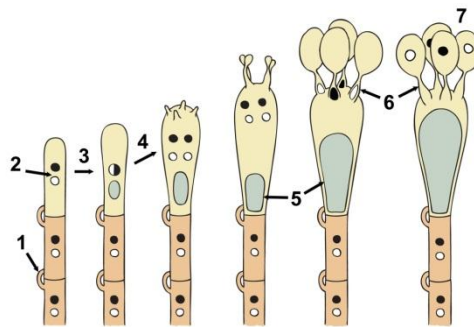
Ovaj tip prionskog nasljeđivanja koristan je za populaciju kada se adaptacija na neki okolišni uvjet treba privremeno prenijeti na potomke uz jednostavnu mogućnost povratka inicijalnog fenotipa (Walker et al. 2016). Bakterije su sposobne usmjeriti rast kvasaca u smjeru nastanka biofilma, no ovaj fenomen tek treba istražiti (Slika. 4.) (Holmes et al. 2013).



Slika 4. [GAR³⁺] kolonije vrste *Saccharomyces cerevisiae* (preuzeto s www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/27894/title/Should-Evolutionary-Theory-Evolve-/).

6.4. Prioni kao uzročnici heterokarionske inkompatibilnosti kod gljivice *Podospora anserina*

Da prioni nisu samo značajni evolucijski faktori među kvascima možemo vidjeti na primjeru saprofitske gljivice *Podospora anserina* (R.Niessl). Ova filamentozna, mala mješinarica često je upotrebljavani modelni organizam čija je reprodukcija izravno ovisna o njenom spolnom ciklusu. Fuzije jezgara, mejozi i nastanku haploidnih spora prethodi fuzija hifa gljive i formiranje heterokariona (Slika.5) (Paoletti et al. 2008). Prionski efekt kod ove se gljivice sastoji u procesu odumiranja hifa prilikom nastanka heterozigotnog heterokariona pa stoga ovu pojavu nazivamo heterokarionska inkompatibilnost. Naime, kada se fuzioniraju hifa s alelom *het-S* i hifa s alelom *het-s*, nastaje heterokarion, Het-S poprima prionsku konformaciju koja je pokretač odumiranja hife. Taj isti prion kod homozigota za alel *het-S* ne pokazuje ovo svojstvo (Saupe 2000., Dalstra et al. 2005.).



Slika 5. Prikaz spolnog razmnožavanja mješinariki. Nakon formiranja heterokariona koji sadrži po 2 jezgre, svaku podrijetlom od jednog roditelja, dolazi do fuzije jezgara unutar stanice koja predstavlja budući askus. Nakon mejoze na askusu se stvaraju askospore iz kojih će se razviti nova haploidna generacija mješinariki (preuzeto s <https://cnx.org/contents/udRzz56Sq@5/Kingdom-Fungi>).

Mehanizam djelovanja ovih proteina nije dovoljno istražen, a u literaturnim izvorima postoji par teorija koje objašnjavaju svrhovitost ovakvog mehanizma. Jedna od njih navodi da je na ovaj način spriječen potencijalni prijenos unutarstaničnih i molekularnih parazita što je primjer još jedne pozitivne uloge priona za održavanje populacije. Drugo rješenje je da na ovaj način gljiva nastoji očuvati genetičku individualnost. S obzirom na to, prion Het-S mogao bi biti glavni uzročnik potencijalnog procesa specijacije kod gljivice *Podospora anserina* (Saupe 2000).

7. ABIOTIČKA EVOLUCIJA I PRIONI U EKSTREMNIM UVJETIMA

Većina znanstvenih krugova danas zastupa RNA-svijet, hipotezu koja objašnjava prijenos nasljedne informacije u Zemljinoj ranoj geološkoj prošlosti. RNA-molekula kao osnova života prije razvoja DNA-sustava uspješno objašnjava kako semikonzervativni model replikacije tako i pojavu metabolizma pošto se pokazalo da mnoge molekule RNA, uključujući i visoko konzervirane rRNA u sastavu ribosoma, imaju katalitičko djelovanje (Andras et al. 2005). Usprkos tome, postoje i škole koje zastupaju takozvanu *protein first hypothesis* pri čemu često koriste model priona za objašnjenje postanka prvih protostanica (Andras et al. 2005).

Problem sa hipotezom RNA-svijeta je izrazita nestabilnost s biokemijskog i geokemijskog stajališta i teška održivost u uvjetima koji su na Zemlji prevladavali tijekom hadeana i arheana. Ekstremne temperature, niski pH vodenog okoliša te konstantna izloženost elektromagnetskim zračenjima niskih valnih duljina faktori su pri kojima se današnje molekule RNA, ali i velika većina proteina gotovo trenutno degradiraju (de Duve et al. 2003).

Prionska domena ne podliježe degradaciji pri povišenim temperaturama, zračenjima niti ekstremnim pH (Heather et al. 2000). Čine ju kratke peptidne sekvence od ponavljajućih N/Q-sljedova koje je moguće generirati u laboratorijskim uvjetima koji imitiraju uvjete u kojima se vjerojatno odvijala abiotička evolucija (Lupi et al. 2006).

Fenomen ekspanzije tripleta je prvi put uočen kod ljudi kao uzrok razvitka Huntingtonove bolesti. Nije ograničen samo na vrstu *Homo sapiens* već je prisutan u cijeloj eukariotskoj domeni. Na ovaj se način u peptidnim sljedovima N i Q povećava broj ponavljanja navedenih aminokiselina koji povećavaju afinitet formiranja prionske domene. Ekspanzija tripleta koji kodiraju N osobito je raširena kod roda *Saccharomyces* (Frenkel et al. 2012).

Postavlja se pitanje uzroka široke očuvanosti ovih ponavljajućih regija u živom svijetu. Postoje indikacije da su točkaste mutacije nastale u ponavljajućim tripletima jedan od osnovnih mehanizama nastanka novih gena što bi značilo da su prioni nusprodukt ovog procesa (Frenkel et al. 2012). S druge strane, ekspanzija tripleta bi mogla dovesti do stvaranja novih tipova priona. Ukoliko se N/Q-sljedovi putem translokacija fuzioniraju sa nekim od transkripcijskih faktora nastaje transkripcijski faktor sa prionskim prekidačem osjetljivim na okolišne uvjete. S obzirom da pojava priona može biti korisna, postoji

moćnost da je ekspanzija tripleta evolucijski očuvana jer dovodi do pojave novih priona. Na ovaj način se povećava varijabilnost priona unutar populacije što je važno kada je populacija pod djelovanjem nekog selektivnog pritiska. Ova teza još nije eksperimentalno niti računalno potvrđena ili opovrgnuta te ostaje tema diskusije.

Prioni su pronađeni u svim carstvima unutar eukariotske domene a računalne metode su pokazale i široku rasprostranjenost u domeni eubakterija dok ovakav tip istraživanja još nije proveden za arheje (Iglesias et al. 2015). Postojanje priona kao jednih od rijetkih biomolekula otpornih na razgradnju u uvjetima okoliša ranog planeta Zemlje, te njihova korisna uloga kod nekih nižih eukariotskih organizama bitna je prednost *protein first hypothesis*. U tom je kontekstu važna i pretpostavka da su abiotički mehanizmi koje su koristile rane protostanice očuvani i u danas živućim organizmima. Primjer za to su FeS_{Ni} kofaktori koje nalazimo u feredoksinu i acetyl-CoA sintazi kod metanogenih arheja i acetogenih bakterija. Ova dva proteina sudjeluju u putu redukcije CO₂ pomoću H₂, a veoma slična razmještanje atoma Fe, Ni i S nalazimo i u mineralnu greigitu iz alkalnih hidrotermalnih vrela, za koji se smatra da je katalizirao metaboličke reakcije koje su prethodile razvoju prve stanice. Ova teorija je značajna jer ukazuje da je prilikom razvitka biokemijskih procesa vjerojatno došlo do očuvanja geokemijskih procesa koji su im prethodili (Sojo et al. 2016). Sukladno s time, ne bi bilo iznenađujuće da su i prioni atavizmi nekih od prvih proteina.

Chernoff i suradnici ustvrdili su da su prioni mogli imati jednu od ključnih uloga u kompartmentalizaciji ranih stanica. Unutar takvih kompartmenata smanjeno je oštećenje molekula RNA. Ova teorija stoga ide u prilog teoriji o koegzistiranju RNA-svijeta i proteinskog svijeta (Lupi et al. 2006). Proteini koji mogu poprimiti prionsku konformaciju s obzirom na to da u prionskoj formi tvore netopive agregate mogu imati i strukturnu ulogu, ali i regulacijsku, ako uzmemo u obzir da ti isti proteini ukoliko nemaju prionsku konformaciju uglavnom djeluju kao transkripcijski faktori. Ako su prioni nekoć i imali stanične funkcije koje nisu uključivale regulaciju ekspresije, a kroz evoluciju su očuvani gotovo isključivo kao transkripcijski faktori to bi značilo da su neke od prvotnih funkcija priona danas zamijenjene učinkovitijim mehanizmima, dok se svojstvo da reguliraju ekspresiju gena djelomično održalo. Neovisno o tome gledamo li prione kroz teoriju o koegzistenciji RNA-svijeta i proteinskog svijeta ili kroz *protein first hypothesis*, svojstvo proteina koji kodiraju prione da formiraju transkripcijske faktore govori nam da su mogli imati ključnu ulogu u evoluciji podražljivosti, budući da im konformacija uglavnom varira o okolišnim uvjetima kao što je povišena temperatura. Ako su prioni sudjelovali u formiranju prve stanice, održavanje

potencijala stanice da tvori prione upućuje da je za razvoj sustava koji efikasno rješava problem ovisnosti transkripcije o okolišnim uvjetima bio potreban prvotni razvoj složenijeg metabolizma i složenijeg sustava replikacije. Ova pretpostavka i sama sadrži puno pretpostavki te je u nedostatku dokaza treba kritički promatrati.

8. JESU LI PRIONI PASIVNI ENTITETI ZAHVAĆENI EVOLUCIJSKIM PROMJENAMA ILI AKTIVNO SUDJELUJU U FORMIRANJU EVOLUCIJSKIH PROCESA?

Postoje dva osnovna mehanizma koja utječu na evolucijski razvoj priona. Jedan od tih mehanizama je promjena nukleotidnog slijeda gena koji kodira protein koji posjeduje sposobnost tvorbe priona. Takvi sljedovi podliježu selektivnom pritisku ovisno o tome kakav je utjecaj priona na vijabilnost i fitness jedinke u uvjetima okoliša u kojem obitava. Drugi mehanizam je selekcija na razini konformacije proteina. Naime, u stanicama poteklama od [PRION] stanica polipeptidi imaju afinitet da formiraju više različitih prionskih konformacija. Eksperimentalno je utvrđeno da kako dolazi do izmjene generacija u populaciji kvasaca broj različitih konformacija se smanjuje dok nije ostao jedan ili par dominantnih konformacijskih oblika. Ovo svojstvo se ispoljava zbog jedne od ključnih osobina priona da mijenjaju trodimenzionalnu strukturu proteina s kojim dijele polipeptidnu sekvencu na način da poprima oblik i osobine samog priona (Wickner et al 2016).

Evolucijski mehanizmi koji utječu na održavanje priona možda će jednog dana objasniti izvorno podrijetlo priona i njihovu ulogu. Osim što je važno razjasniti kako prioni evoluiraju kroz vrijeme, interes sve većeg broja znanstvenika usmjeren je na problem utjecaja priona kao epigenetičkih faktora nasljeđivanja na samu evoluciju (Wickner et al 2016).

Zanimljivo je da iako su se računalnim pretraživanjem genoma pronašle mnoge potencijalne prionske domene, tek mali dio njih ima sposobnost da stvori prionsku molekulu nakon translacije. Angarica i suradnici testirali su 2012. efikasnost algoritama koji na osnovu udjela N i Q genomu predviđa vjerojatnost da gen formira priona. Računalno su predvidjeli koje regije u genomu mogu kodirati za prione, potom su slučajnim odabirom odabrali 29 takvih regija te eksperimentalno provjeriti posjeduju li proteini za koje kodiraju mogućnost formiranja priona. Pokazano je da 11 sjedova za koje je predviđeno da kodiraju prione uistinu

imaju sposobnost tvorbe priona. Međutim 18 od 29 ta sposobnost nedostaje stoga računalni testovi daju značajan udio lažno pozitivnih rezultata (Angarica et al. 2013).

Usprkos tome, pokazano je da je veoma mala promjena u nukleotidnom, tj. aminokiselinskom slijedu dovoljna da uzrokuje formiranje priona. Geni koji kodiraju potencijalne prionske domene također brže evoluiraju i pokazuju veći polimorfizam. Uzrok ovome je činjenica da afinitet proteina da formira prion ovisi prije svega o udjelu N i Q, a ne o slijedu tih aminokiselina u genu koji kodira za prion formirajuće prione. Koja je moguća interpretacija ovakvih rezultata? R. B. Wickner i A.C. Kelly predlažu da postojanje priona u populaciji pomaže održavanju vrste u uvjetima stresa (Wickner et al 2016). Pozitivnu ulogu priona u stresnim uvjetima možemo vidjeti na primjeru priona koji uzrokuje [MOT3⁺]-fenotip. Naime kada stanice kvasca rastu na podlogama koje sadrže samo siromašne izvore ugljika i dušika, stanice sa [MOT3⁺] fenotipom mogu kao izvor ugljika koristiti glicerol i etanol, a kao izvor dušika prolin (Holmes et al. 2013). Osim toga, pokazuju manju osjetljivost na fungicide. Stanice sa [GAR⁺]-fenotipom koriste etanol kao primarni izvor ugljika (Heather et al. 2000). Ovo svojstvo je važno u prilikom fermentacije groždanog soka kada dolazi do povećanja količine etanola u okolišu, koji je otpadni produkt metabolizma kvasca tokom fermentacije. Kvasci ne mogu preživjeti kada koncentracija etanola dosegne 12% ukupnog volumnog udjela u fermentirajućem groždanom soku. Stanice kvasaca sa [GAR⁺]-fenotipom koriste etanol kao osnovnog izvora ugljika, čime se usporava porast volumnog udjela etanola u groždanom soku i dolazi do produljenja životnog vijeka kako samih [GAR⁺] kvasaca, tako i cjelokupnog mikrobioma u fermentirajućem groždanom soku (Walker et al. 2016).

U normalnim uvjetima nalazimo jednu stanicu 'inficiranu' prionima na 1 milijun stanica kvasaca. To osigurava da ukoliko se pojava priona pokaže negativnom za preživljenje jedinke nema velikog utjecaja na ukupnu populaciju. Za vrijeme stresnih uvjeta upravo takvi rijetki fenomeni glavni su faktori održavanja vrste koji podliježu selekciji i pokreću evolucijske procese. Zbog toga je primijećeno da pri stresnim uvjetima dolazi do povećanja udjela priona u cjelokupnom proteomu (Heather et al. 2000). Povećana ekspresija proteina koji imaju afinitet poprimanja prionske konformacije također povećava vjerojatnost ispoljavanja prionskog fenotipa (Holmes et al. 2013).

Dugo je vremena glavna zamjerka tezi o pozitivnoj ulozi priona bila činjenica da su takvi sojevi dobiveni isključivo u laboratorijskim uvjetima. Ovaj argument je demantiran istraživanjem u kojem su od 700 testiranih prirodnih sojeva kvasaca prionske molekule

pronađene u trećini od njih. Jedan od njih je soj koji se razvija u vinskoj kulturi, prirodno tvori prione i povećava mogućnosti preživljavanja soja u prisutnosti antifungicida, tj. stresnog agensa. (Heather et al. 2000, Frederick et al. 2014)

Kako god, iako postoje prioni koji u određenim uvjetima mogu stanicama osigurati selektivnu prednost neispravno bi bilo reći da prioni imaju isključivo pozitivnu ulogu u stanicama. Dapače, u uobičajenom okolnostima efekti kao što su nefunkcionalne konformacije proteina, formiranje amiloidnih vlakana i produženje C-terminalne domene smanjuju fitness jedinke. Zbog toga su kvasci razvili anti-prionske sustave kao što su Hsp42 koji uklanjaju prionske forme proteina. I dok taj sustav efikasno djeluje na uzročnike [URE3⁺], nema efekta na [PSI⁺] koji je glavni uzročnik ekspresije kriptičke varijabilnosti (Wickner et al. 2016).

9. ZAKLJUČAK

Prioni kao infektivne čestice i danas, 35 godina nakon što su prvi put opisani, predstavljaju svojevrsnu znanstvenu enigmu. Njihova evolucija i utjecaj na evoluciju organizama još je uvijek zagonetka te ne postoji sveobuhvatna hipoteza koja bi zadovoljavajuće opisala ovu problematiku. Usprkos tome nastojanja da se na ovo pitanje odgovori rezultirala su nizom zaključaka donesenih proučavanjem prije svega vrste *Saccharomyces cerevisiae*. (Feldmann 2010).

Nakon što su otkriveni, prioni su dugo vremena su bili smatrani isključivo infektivnim subatomske česticama koji smanjuju vijabilnost organizma. Međutim, proučavanjem pekarskog kvasca pronađeni su prioni od kojih neki imaju pozitivan utjecaj na preživljenje jedinke, neki negativan, a u većini slučajeva utjecaj priona na fitness i vijabilnost jedinke ovisi o okolišnim uvjetima (Heather et al. 2000). Prioni su jedan od ključnih faktora u održavanju simbiotskih odnosa u grožđanom soku u procesu fermentacije, a u slučaju gljivice *Podospora anserina* mogli bi imati ključnu ulogu u očuvanju genetičkog identiteta jedinke (Saupe 2000, Brown et al. 2009). Prioni su faktori ispoljavanja kriptičke genetičke varijabilnosti, podložni su selekciji na razini slijeda nukleotida, ali i na osnovi konformacije, a njihova stabilnost pri ekstremnim uvjetima skupa s poboljšanim svojstvima propagacije pri istim jedan je od razloga zašto ih određeni krugovi znanstvenika smatraju glavnim akterima abiotičke evolucije (An et al. 2016).

Mnogi genski sljedovi koji kodiraju za polipeptide podložne prionskom smatanju imaju očuvan afinitet formiranja priona koji najčešće dolazi do izražaja prilikom mutacija samih sljedova (Wickner et al 2016). Potencijal proteina da formiranja prione je bitan jer u promjenjenim uvjetima okoliša može rezultirati fenotipom koji će jedinki omogućiti preživljavanje. Unatoč tome, prioni mogu i negativno djelovati na preživljenje jedinke. Zbog toga je u povoljnim uvjetima okoliša bitno održati homeostazu organizma i izbjeći formiranje priona. Može se reći da populacija drži prione u "stanju pripravnosti". Ukoliko takva populacija biva izložena nekom negativnom okolišnom utjecaju, već će mala mutacija biti dovoljna da dođe do ekspresije prionskog fenotipa. Ono što je razlika između populacija kvasaca u stabilnim i promjenjivim okolišnim uvjetima je što će u stabilnom okolišnim uvjetima selekcija preferirati jedinke koje nisu izrazile prionski fenotip, dok će u promjenjivim uvjetima okoliša u većem udjelu preživljavati one jedinke koje imaju prionski fenotip. Važno je primijetiti da iako je za populaciju važno reducirati ekspresiju prionskog fenotipa kada su uvjeti u okolišu stabilni, za dugoročno održanje vrste je poželjno da u populaciji ostane očuvan i genetski potencijal formiranja proteina koji potencijalno mogu formirati prione.

Važno je imati na umu da čvrstih dokaza o značajnosti priona za evoluciju nižih eukariotskih organizama nema. Jedno od ključnih pitanja na koje još nije pronađen odgovor je može li molekularna selekcija među prionskim varijantama imati značajniji dugotrajni utjecaj na vrste i populacije. I danas evolucionjske procese prvenstveno proučavamo iz darvinističkog kuta gledanja. Filogenetičari s razlogom koriste promjene u jednodimenzionalnom slijedu DNA kao osnovnu komponentu koja razdvaja jednu vrstu od druge. S obzirom da je upravo DNA ključni element nasljeđivanja ovaj pristup je bez dvojbe ispravan i bez konkurencije prilikom promatranja evolucionjskih procesa.

No bez obzira na to, pokazalo se da organizmi nasljeđuju mnogo više od genomskog slijeda. Danas se sve više uviđa značaj epigenetičkih faktora za nasljeđivanje i ispoljavanje fenotipskih značajki (Grossniklaus et al. 2013). Interakcije između priona i proteina, kao i kondenziranost kromatina kompleksni su sustavi koji su po pitanju metodologije modeliranja u nezahvalnom položaju naprema sustavima kao što su sljedovi nukleotida ili aminokiselina.

Usprkos tome, daljnja istraživanja ovog područja su poželjna, ne samo zbog spoznavanja odgovora na neka fundamentalna biološka pitanja, već i zbog toga što iz proučavanja priona kvasaca možemo mnogo naučiti o neurodegenerativnim bolestima kao što

su Parkinsonova ili Alzheimerova bolest (An et al. 2016). Nastanak dijabetesa se u zadnje vrijeme također pokušava objasniti proučavanjem promjena metaboličkih navika kvasaca nastalih zbog pojave priona (Bitel et al. 2010). S obzirom na sve obilnije znanje koje stječemo o ovim fascinantnim molekulama u budućnosti možemo očekivati da će ovo područje istraživanja sve više dobivati na važnosti.

10. LITERATURA

- Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., and Lindquist S. (2009.): A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* 137, 146–158
- An.L., Fitzpatrick D., Harrison P.(2016.): Emergence and evolution of yeast prion and prion-like proteins. *BMC Evolutionary Biology* DOI: 10.1186/s12862-016-0594-3
- Andras P., Andras C. (2005.) The origins of life - the 'protein interaction world' hypothesis: protein interactions were the first form of self-reproducing life and nucleic acids evolved later as memory molecules. *Medical hypotheses* 64, 678-688.
- Angarica V.E., Ventura S., Sancho J. (2013.) Discovering putative prion sequences in complete proteomes using probabilistic representations of Q/N-rich domains. *BioMedCentral* 14, 316
- Bitel C.L., Feng Y., Souayah N., Frederikse P.H. (2010.): Increased expression and local accumulation of the prion protein, Alzheimer A β peptides, superoxide dismutase 1, and nitric oxide synthases 1 & 2 in muscle in a rabbit model of diabetes. *BMC physiology* DOI: 10.1186/1472-6793-10-18
- Brown J.C., Lindquist S. (2009.): A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes & development* 23, 2320-2332
- Celio G.J., Padamsee M., Dentinger B.T.M. (2006): Assembling the fungal tree of life: constructing the structural and biochemical database. *Mycologia* 6, 850-859
- Crow E.T., Li L. (2011.): Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 452– 459
- Dalstra H.J., van der Zee R., Swart K., Hoekstra R.F., Saupe S.J., Debets A.J.. (2005.): Non-mendelian inheritance of the Het-s prion or Het-s prion domains determines the *het-S* spore killing system in *Podospora anserina*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 42, 836-847
- de Duve C. (2003.): A research proposal on the origin of life. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life* 33, 559–574.
- Feldmann, H. (2010). *Yeast: molecular and cell biology* 1. izdanje, 22-23
- Frederick K.K., Debelouchina G.T., Kayatekin C., Dorminy T., Jacavone A.C., Griffin R.G., Lindquist S. (2014.): Distinct prion strains are defined by amyloid core structure and chaperone binding site dynamics. *Chemistry & biology* 21, 295-305
- Frenkel Z.M., Trifonov E.N. (2012.): Origin and evolution of genes and genomes. Crucial role of triplet expansions. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 30, 201-210
- Grossniklaus U., Kelly W.G., Ferguson-Smith A.C., Pembrey M., Lindquist S. (2013.): Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? *Nature Reviews Genetics* 14, 228-235
- Guillaume C., Delobel P., Sablayrolles J.M., Blondin B. (2007.): Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated *hxt3* allele enhances fructose fermentation. *Applied and environmental microbiology* 73, 2432-2439
- Heather L., Lindquist S.(2000.): A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* 407, 477-483

- Holmes D.L., Lancaster A.K., Linquist S., Halfmann R. (2013.): Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion. *Cell* 153, 153–165
- Hope E.A., Dunham M.J. (2014.): Ploidy regulated variation in biofilm-related phenotypes in natural isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 : genes - genomes – genetics* 4, 1773-1786
- Iglesias V., de Groot, N.A., Ventura S. (2015.): Computational analysis of candidate prion-like proteins in bacteria and their role. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1123.
- Koschwanez J.H., Foster K.R., Murray A.W. (2011.): Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. *PLOS Biology* DOI/10.1371/annotation/0b9bab0d-1d20-46ad-b318-d2229cde0f6f
- Liberski P.P. (2012.): Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 50, 1-12
- Lupi O., Dadalti P., Cruz E., Sanberg P.R. (2006.): Are prions related to the emergence of early life? *Medical hypotheses* 67, 1027-1033
- Masel J., Bergman A. (2003.): The evolution of the evolvability properties of the yeast prion [PSI⁺]. *Evolution* 57, 1498–1512
- Paoletti M., Saupé S.J. (2008.): The genome sequence of *Podospora anserina*, a classic model fungus. *Genome Biology* 9, 223
- Pfeiffer T., Schuster S., Bonhoeffer S. (2001.): Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504-507
- Romanova N.V., Chernoff Y.O. (2009.) Hsp104 and prion propagation. *Protein Pept. Lett*, 6, 598–605
- Saupé S.J. (2000.) Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 489–502
- Sharma A., Bruce K.L., Chen B., Gyoneva S., Behrens S.H., Bommarius A.S., Chernoff Y.O. (2016.): Contributions of the prion protein sequence, strain and environment to the species–barrier. *The Journal of biological chemistry* 291, 1277-1288
- Sojo V., Herschy B., Whicher A., Camprubi E., Lane N. (2016) The origin of life in alkaline hydrothermal vents. *Astrobiology* 16, 181-97
- Shorter J., Lindquist S. (2005.): Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nature Reviews Genetics* 6, 435-450
- Walker G.A., Hjelmeland A., Bokulich N.A., Mills D.A., Ebeler S.E., Bisson L.F. (2016.): Impact of the [GAR⁺] prion on fermentation and bacterial community composition with *Saccharomyces cerevisiae* UCD932. *Am J Enol Vitic.* 67, 296-307
- Wickner R.B., Kelly A.C. (2016.): Prions are affected by evolution at two levels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, 1131-44
- cnx.org/contents/uVdR6VSq@5/Kingdom-Fungi (pristup 30.5.2016.)
- www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/27894/title/Should-Evolutionary-Theory-Evolve-/ (pristup 4.7.2016.)

11. SAŽETAK

Prioni su infektivne čestice isključivo proteinske građe. Iako su prvi prioni opisani kao uzročnici neurodegenerativnih obolježja sisavaca danas se zna da su distribuirani unutar cijele eukariotske domene. *Saccharomyces cerevisiae* (F.Meyen et. E.C. Hansen) (pekarski kvasac) vodeći je modelni organizam koji se koristi u istraživanju ovog područja. U ovom seminaru opisujem potencijalne funkcionalne uloge priona u stanicama kvasca, njihovu evoluciju te posebni naglasak stavljam na mogući utjecaj priona na usmjeravanje evolucijskih procesa. Iako postoje mnoge naznake o aktivnoj ulozi priona kao evolucijskih čimbenika, danas ne postoje čvrsti dokazi koji bi jednoznačno potvrdili ovu tezu.

12. SUMMARY

Prions are considered infectious agents composed entirely of proteinaceous material. Although they were first described as the causal agents of neurodegenerative diseases in mammals, nowadays prions are known to be distributed throughout the eukaryotic domain. *Saccharomyces cerevisiae* (F.Meyen et. E.C. Hansen) (budding yeast) is the most prominent model organism in this scientific field. In this thesis, potential prion functions in yeast are dealt with their evolution and their influence in evolutionary processes. Despite there are some indications that prions may play an important evolutionary role, we still do not have enough experimental evidence to confirm this hypothesis.