

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Luka Andrišić

**Mehanizmi stanične toksičnosti uzrokovani višestruko nezasićenim
masnim kiselinama – pristup kvascem**

Doktorski rad

Zagreb, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Luka Andrišić

**Mehanizmi stanične toksičnosti uzrokovani višestruko nezasićenim
masnim kiselinama – pristup kvascem**

Doktorski rad

Doktorski rad predložen
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije
u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti
na Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom
studiju Molekularne bioznanosti

Zagreb, 2013.

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za oksidacijski stres u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Ane Čipak Gašparović te u Laboratoriju za genetiku kvasca i molekularnu biologiju Instituta za molekularne bioznanosti pri Sveučilištu Karl Franz u Grazu u Austriji, voditelja Prof.dr.sc. Seppa Kohlweina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

Mehanizmi stanične toksičnosti uzrokovani višestruko nezasićenim masnim kiselinama – pristup kvascem

Luka Andrišić

Rad je izrađen u: Laboratoriju za oksidacijski stres u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu.

Mentor/i: dr.sc. Ana Čipak Gašparović

Kratki sažetak doktorskog rada: Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) za većinu organizama uključujući i čovjeka su esencijalne, no u određenim uvjetima mogu biti toksične za organizam. Osim poremećaja ravnoteže sastava ω -3 i ω -6 PUFA, koje mogu dovesti do različitih patofizioloških stanja, PUFA su podložne oksidacijskim oštećenjima kao rezultat procesa lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je uključena u brojne patofiziološke procese u organizmu, te predstavlja potencijalnu opasnost za sve aerobne organizme koji sadrže PUFA. Koristeći model transgenog kvasca (*S. cerevisiae*) koji proizvodi PUFA, u ovom radu ispitana je uloga procesa β -oksidacije u adaptivnom odgovoru kvasca na prisutnost PUFA. Također napravljena je detaljna analiza promjena koje se dešavaju u metabolizmu glicerofosfolipida i triacilglicerida tijekom adaptacije kvasca na prisutnost PUFA. U konačnici, identificirani su pojedini geni koji sudjeluju u adaptivnom odgovoru stanica kvasca na uvjete oksidacijskog stresa u prisutnosti PUFA.

Broj stranica: 170

Broj slika: 53

Broj tablica: 14

Broj literaturnih navoda: 204

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: PUFA, lipidi, lipidne vrste, oksidacijski stres, β -oksidacija, ROS, adaptacija, antioksidacijska zaštita

Datum obrane: 23. srpnja 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr.sc. Branka Mihaljević**, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, predsjednica
2. **Dr.sc. Ana Čipak Gašparović**, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, mentor
3. **Prof.dr.sc. Vera Cesar**, izvanredna profesorica, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, član

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Field: Biology and Basic Medical Sciences

Mechanisms of cellular toxicity induced by polyunsaturated fatty acids – yeast approach.

Luka Andrišić

Thesis performed at: Laboratory for oxidative stress, Department for molecular medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb.

Supervisor/s: Ana Čipak Gašparović, PhD

Short abstract: Despite being essential for the most organisms, including humans, polyunsaturated fatty acids (PUFA) are toxic in specific conditions. Disturbance of the balance between ω -3 and ω -6 PUFA can lead to various pathophysiological conditions in humans. PUFAs are also prone to oxidative damage, which can lead to lipid peroxidation. Lipid peroxidation is involved in many pathophysiological processes in various organisms, and as such present potential risk for all aerobic organisms that have PUFA. We have investigated the role of β -oxidation in the process of adaptation of yeast cell to PUFA presence by using transgenic yeast that can produce PUFA. In addition, we have analyzed changes at the level of glycerophospholipid and triacylglyceride metabolism, during adaptation to PUFA presence. Finally, specific genes that are involved in adaptive response of yeast cells to conditions of oxidative stress in PUFA presence were identified.

Number of pages: 170

Number of figures: 53

Number of tables: 14

Number of references: 204

Original in: Croatian

Key words: PUFA, lipids, lipid species, oxidative stress, β -oxidation, ROS, adaptation, antioxidative defence

Date of the thesis defense: 23rd July 2013.

Reviewers:

1. Branka Mihaljević, PhD
2. Ana Čipak Gašparović, PhD
3. Prof. Vera Cesar, PhD

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Zahvaljujem se svojoj mentorici Ani Čipak Gašparović na podršci i razumijevanju tijekom planiranja, izrade i pisanja rada.

Velika hvala voditelju laboratorija dr.sc. Nevenu Žarkoviću na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju.

Također, zahvaljujem se svim članovima LabOS-a na pomoći tijekom izrade eksperimenata.

Posebno se zahvaljujem prof.dr.sc. Seppu Kohlweinu i cijeloj njegovoj grupi na pruženoj prilici i materijalnoj pomoći koji su značajno doprinijeli kvaliteti rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Branki Mihaljević i Ivani Tartaro Bujak na pomoći oko izrade eksperimenata.

Najveća hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	VIŠESTRUKO NEZASIĆENE MASNE KISELINE –STRUKTURA, FUNKCIJA, ŽIVOT.....	2
1.1.1.	KLASIFIKACIJA PUFA.....	2
1.1.2.	BIOSINTEZA PUFA.....	4
1.1.2.1.	Klasifikacija desaturaza.....	5
1.1.3.	BIOLOŠKA FUNKCIJA PUFA.....	6
1.1.3.1.	PUFA i biomembrane.....	8
1.1.3.2.	Raznolikost PUFA.....	11
1.1.3.3.	PUFA i čovjek.....	11
1.1.4.	MEHANIZMI REGULACIJE DESATURACIJE MEMBRANA.....	14
1.1.5.	RAZREDI FOSFOLIPIDA.....	16
1.1.5.1.	Putovi sinteze glicerolipida.....	18
1.1.5.2.	Transport i distribucija fosfolipida.....	19
1.1.5.3.	Biološka funkcija pojedinih lipidnih razreda.....	21
1.2.	PUFA i LIPOTOKSIČNOST.....	23
1.2.1.	RAVNOTEŽA ω -3 i ω 6 PUFA.....	23
1.2.2.	PUFA I OKSIDACIJSKI STRES.....	23
1.2.2.1.	Izvori ROS-a u organizmu.....	25
1.2.3.	MEHANIZMI OBRANE OD OKSIDACIJSKOG STRESA.....	27
1.2.3.1.	Neenzimatski antioksidacijski sustavi.....	27
1.2.3.2.	Enzimatski antioksidacijski sustavi.....	28
1.3.	KVASAC.....	30
1.3.1.	KVASAC KAO MODELNI ORGANIZAM.....	30
1.3.2.	BIOLOGIJA KVASCA.....	31
1.3.3.	KVASAC KAO MODEL U ISTRAŽIVANJU METABOLIZMA PUFA I LIPIDNE PEROKSIDACIJE	32
1.3.3.1.	β -Oksidacija.....	33
1.4.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	35
2.	MATERIJALI I METODE.....	36
2.1.	SOJEVI KVASCA I UVJETI RASTA.....	37
2.1.1.	Plazmid pYES2.....	37
2.1.2.	Sojevi kvasca.....	38

2.1.3.	Hranjivi mediji i otopine.....	39
2.1.4.	Uvjeti i praćenje rasta stanica.....	41
2.2.	TRANSFORMACIJA i IZOLACIJA PLAZMIDA.....	42
2.2.1.	Transformacija kvasca.....	42
2.2.2.	Izolacija plazmida iz <i>E. coli</i>	42
2.2.3.	Priprema kompetentnih stanica <i>E. Coli</i>	43
2.2.4.	Transformacija kompetentnih stanica.....	44
2.3.	ISPITIVANJE UTJECAJA PUFA NA MUTANTE UKLJUČENE U PROCES β-OKSIDACIJE.....	44
2.3.1.	Utjecaj PUFA na fiziologiju rasta.....	44
2.3.2.	Određivanje osjetljivosti na oksidacijski stres.....	45
2.3.3.	Određivanje unutarstaničnog ROS-a.....	45
2.3.4.	Priprema uzoraka za kolorimetrijske metode.....	46
2.3.5.	Određivanje koncentracije proteina.....	46
2.3.6.	Određivanje koncentracije unutarstaničnog glutationa.....	46
2.3.7.	Određivanje aktivnosti katalaze.....	47
2.3.8.	Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaza	48
2.4.	KROMOSOMSKA UGRADNJA GENA ZA Δ12 DESATURAZU.....	48
2.4.1.	Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	50
2.4.2.	Defosforilacija i ligacija.....	51
2.4.3.	PCR na kolonijama.....	51
2.4.4.	Razgradnja restrikcijским enzimima.....	52
2.4.5.	DNA elektroforeza na agaroznim gelovima.....	52
2.5.	ANALIZA MASNIH KISELINA I LIPIDA.....	53
2.5.1.	Ekstrakcija lipida.....	53
2.5.2.	Analiza masnih kiselina.....	54
2.5.3.	Analiza lipida.....	55
2.6.	„SYNTHETIC GENETIC ARRAY “ – SGA.....	56
2.6.1.	Princip metode.....	56
2.6.2.	Selekcija jednostrukih mutanata sa genom za Δ 12 desaturazu.....	58
2.6.3.	Obrada rezultata.....	61
2.7.	POTVRDA FENOTIPOVA i SOJEVA DOBIVENIH METODOM SGA.....	61
2.7.1.	Potvrda mutanata metodom PCR.....	61
2.7.2.	Potvrda fenotipova.....	62

2.7.2.1.	Test na pločama.....	64
2.7.2.2.	„Bioscreen“.....	64
2.8.	STATISTIČKA ANALIZA.....	65
3.	REZULTATI.....	66
3.1.	ULOGA β-OKSIDACIJE U ADAPTACIJI NA PRISUTNOST PUFA..	67
3.1.1.	Fiziologija rasta i proizvodnja ROS-a.....	67
3.1.2.	Antioksidacijski odgovori	69
3.1.3.	Osjetljivost sojeva na oksidacijski stres.....	71
3.2.	KARAKTERIZACIJA SOJA S KROMOSOMSKI UGRAĐENIM GENOM ZA Δ12 DESATURAZU.....	73
3.3.	ANALIZA LIPIDA.....	74
3.3.1.	Suplementacija oleinskom kiselinom (18:1).....	91
3.4.	„SYNTHETIC GENETIC ARRAY“ – SGA.....	109
3.4.1.	SGA – oksidacijski stres.....	111
3.4.1.1.	Potvrda mutanata osjetljivih na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA.....	115
4.	RASPRAVA.....	122
5.	ZAKLJUČCI.....	144
6.	LITERATURA.....	147
7.	SAŽETAK.....	159
8.	SUMMARY.....	163
9.	ŽIVOTOPIS.....	167

1. UVOD

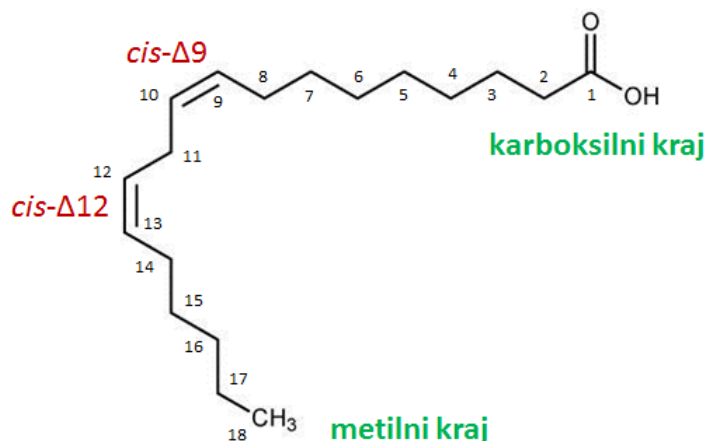
Višestruko nezasićene masne kiseline (eng. polyunsaturated fatty acids, PUFA) su esencijalni gradivni spojevi bioloških membrana kod većine eukariota. Osim važne uloge u moduliranju fizikalnih svojstava bioloških membrana i posljedično tome reguliranju važnih membranskih procesa, PUFA imaju važnu ulogu i kao signalne molekule, te kao transkripcijski aktivatori gena [1, 2]. Može se reći da PUFA ispunjavaju mnoge strukturne i funkcionalne uloge koje su neusporedive među masnim kiselinama s obzirom na široki spektar bioloških procesa u kojima sudjeluju. Međutim, mehanizmi kojima stanica regulira točan sastav PUFA u membranskim lipidima i procesi kojima pogoduje takav točno definiran sastav PUFA nisu ni približno razjašnjeni. Unatoč velikoj raznolikosti i specifičnim svojstvima određenih vrsta PUFA, njihova zajednička karakteristika je da su u uvjetima oksidacijskog stresa podložne lipidnoj peroksidaciji, autokatalitičkom procesu degradacije lipida [3]. Oksidacijski stres može nastati kao posljedica poremećaja metabolizma kisika, i predstavlja potencijalnu opasnost za sve aerobne organizme [4]. Lipidna peroksidacija uzrokuje narušavanje integriteta bioloških membrana i stvaranje potencijalno toksičnih reaktivnih aldehida [5]. Pokazano je da lipidna peroksidacija ima ulogu u procesu starenja, te mnogim patološkim stanjima kod čovjeka uključujući neurodegenerativne bolesti, dijabetes, bolesti jetre, kardiovaskularne bolesti i tumore [6-9]. Stoga je u interesu istražiti procese lipidne peroksidacije kao i obrambene mehanizme zaštite stanice od oksidacijskih oštećenja PUFA.

1.1. VIŠESTRUKO NEZASIĆENE MASNE KISELINE – STRUKTURA, FUNKCIJA, ŽIVOT

1.1.1. KLASIFIKACIJA PUFA

PUFA su masne kiseline s dvije ili više dvostrukih veza između dva ugljikova atoma u ugljikovodičnom lancu masnih kiselina. Pojednostavljena nomenklatura, koja se često koristi za klasifikaciju PUFA u biološkim sustavima je omega (ω) ili n nomenklatura, prema kojoj se označava položaj posljednje dvostruke veze od metilnog kraja ugljikovodičnog lanca [10]. Delta (Δ) klasifikacija označava poziciju dvostruke veze u lancu masne kiseline određenu brojanjem veza počevši od karboksilne skupine [11]. Tako npr. 18:2, ω -6 označava linolnu kiselinu, PUFA koja ima osamnaest atoma ugljika i ukupno dvije dvostruke veze, s prvom

dvostrukom vezom na šestom C-atomu od metilnog kraja lanca. Dvostruke veze u PUFA se većinom u biološkim sustavima nalaze u *cis* konfiguraciji (slika 1). Najčešće PUFA koje se pojavljuju u biološkim sustavima su ω -6 i ω -3, a broj atoma ugljika u ugljikovodičnom lancu obično varira između 18 i 22 i gotovo uvijek je paran, dok broj dvostrukih veza može varirati između dvije do šest [2]. Popis najzastupljenijih PUFA u biološkim sustavima je naveden u tablici 1.



Slika1. Struktura linolne kiseline *cis* Δ 9,*cis* Δ 12-18:2, ω -6. Za razliku od zasićenih masnih kiselina u kojima jednostruke veze tvore ravne lance, dvostruke veze u *cis* konfiguraciji uzrokuju zakrivljenost lanca nezasićenih masnih kiselina.

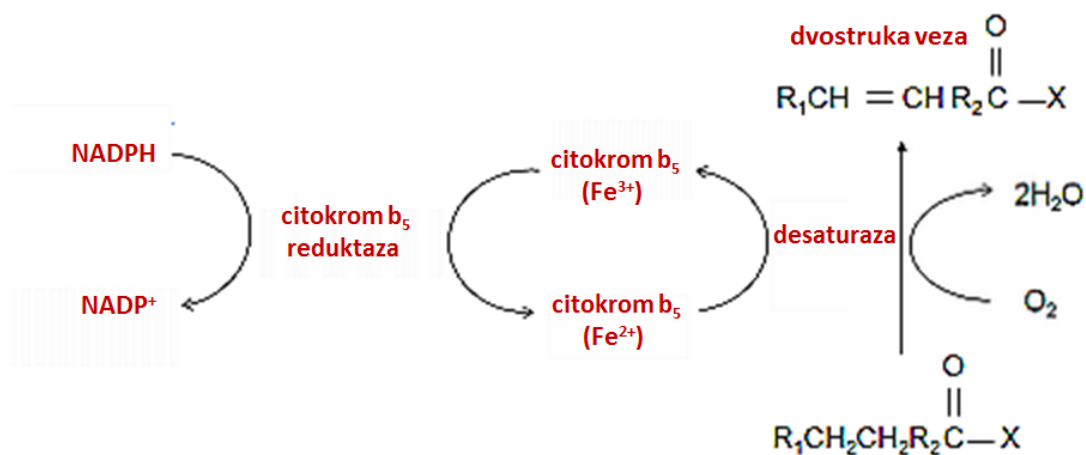
Tablica 1. Najzastupljenije PUFA u biološkim sustavima, uključujući i čovjeka.

PUFA	skraćénice	klasa
linolna	LA	18:2, ω -6
α -linolenska	ALA	18:3, ω -3
γ -linolenska	GLA	18:3, ω -6
dihomo- γ -linolenska	DGLA	20:3, ω -6
arahidonska	AA	20:4, ω -6
eikosapentaenska	EPA	20:5, ω -3
dokosapentaenska	DPA	22:5, ω -6
dokosaheksaenska	DHA	22:6, ω -3

1.1.2. BIOSINTEZA PUFA

Sinteza masnih kiselina je ubikvitaran proces koji se dešava u svim organizmima. Osnovni prekursor u ovom procesu je acetil-koenzim A (acetil-CoA) koji se u inicijalnom koraku sinteze masnih kiselina pomoću enzima acetil-CoA karboksilaze (Acc1) konvertira u malonil-CoA [12, 13]. Od malonil-CoA se pomoću enzima sintetaze masnih kiselina dalje sintetiziraju masne kiseline u ponavljajućim koracima elongacije, prilikom čega se koristi acetil-CoA i redukcijski ekvivalent, NADPH. Najčešće masne kiseline koje nastaju ovakvom *de novo* sintezom su palmitinska (16:0) i stearinska (18:0).

Za uvođenje dvostrukih veza u ugljikovodične lance masnih kiselina odgovorna je skupina evolucijski konzerviranih enzima zajedničkog naziva desaturaze, koje se pojavljuju u svim domenama živog svijeta, od bakterija, gljiva, biljaka i životinja pa sve do čovjeka [14, 15]. Većina desaturaza u biološkim sustavima su integralni membranski proteini i najčešće su smještene unutar membrana endoplazmatskog retikuluma (ER). Proces desaturacije masnih kiselina uključuje kompleksne korake prijenosa elektrona između citokroma b_5 , NAD(P)H, molekularnog kisika i masnih kiselina [16] (slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz procesa uvođenja dvostruke veze u zasićene lance masnih kiselina. Desaturaze kataliziraju prijenos elektrona s reduciranog citokroma b_5 i zasićene masne kiseline, prilikom čega dolazi do redukcije molekularnog kisika u vodu i stvaranja dvostruke veze.

Iako su osnovnim mehanizmom djelovanja konzervirane, desaturaze se međusobno razlikuju prema mjestu uvođenja dvostruke veza gledano od karboksilnog kraja masne kiseline, što se koristi u njihovoj klasifikaciji (nomenklatura). Do sada je opisano barem deset različitih vrsta desaturaza: $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 8$, $\Delta 9$, $\Delta 10$, $\Delta 11$, $\Delta 12$, $\Delta 13$ i $\Delta 15$, s time da broj i vrste desaturaza koje nalazimo unutar različitih vrsta i domena živog svijeta značajno

variraju [14, 17]. Kod višestaničnih organizama, poput čovjeka, desaturaze pokazuju tkivnu specifičnost i pojavu izoformi, odnosno postoje razlike u broju i vrsti desaturaza, te njihovoj aktivnosti ovisno o vrsti stanica i organa [11, 17]. Desaturaze djeluju u tandemu sa skupinom enzima nazvanih elongaze koje sudjeluju u daljnjem produžavanju lanaca PUFA, pri čemu nastaju dugolančane PUFA najčešće s 20 ili 22 atoma ugljika i četiri do šest dvostrukih veza (slika 3). Elongaze produžuju PUFA uvijek s karboksilnog kraja lanca, u koracima od po dva ugljikova atoma, koristeći kao supstrat acetyl-CoA.

1.1.2.1 Klasifikacija desaturaza [17]

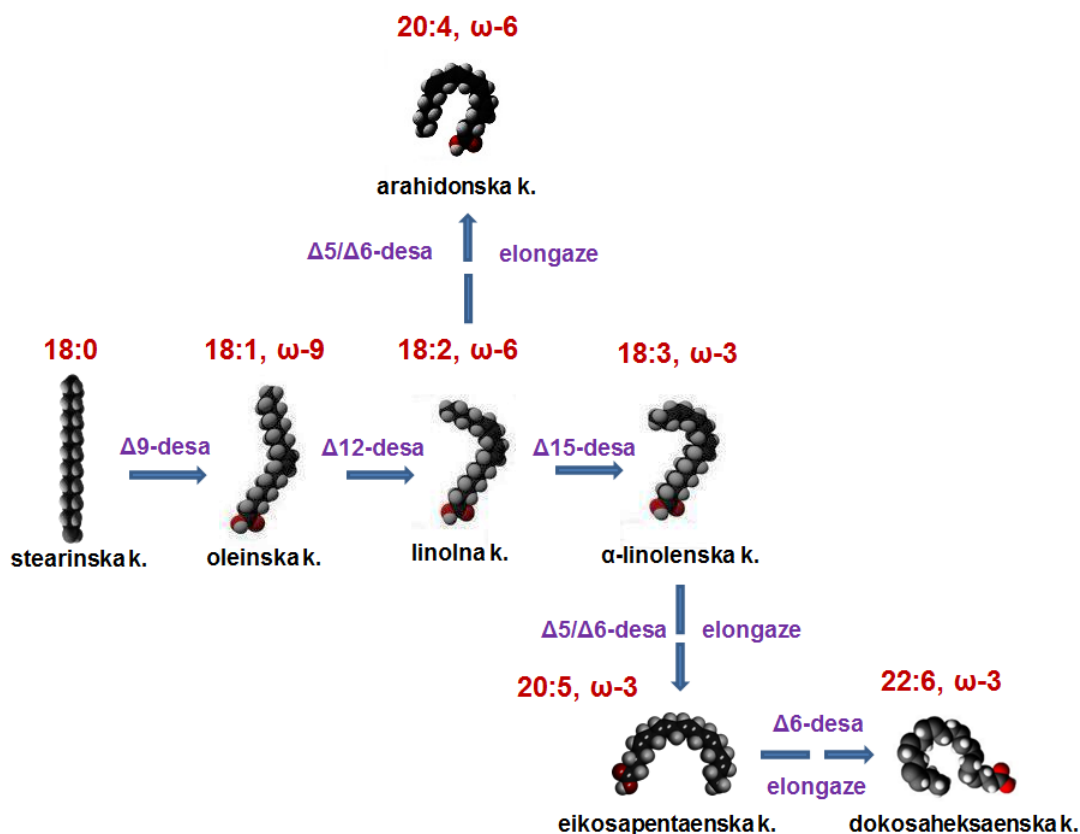
Neki autori svrstavaju desaturaze u četiri podporodice:

a) Prve desaturaze: Stearyl-CoA desaturaze (SCD) koje se svrstavaju u $\Delta 9$ desaturaze i uvode prvu dvostruku vezu u lanac zasićenih masnih kiselina, najzastupljenija su skupina desaturaza te su prisutne u svim domenama živog svijeta. Njihovim djelovanjem nastaju jednostruko nezasićene masne kiseline, a najučestalije su palmitoleinska (C16:1, ω -9) i oleinska kiselina (C18:1, ω -9).

b) Omega desaturaze: $\Delta 12$ i $\Delta 15$ desaturaze, koje uvode dodatnu dvostruku vezu u nezasićene masne kiseline i to između postojeće dvostruke veze i metilnog kraja ugljikovodičnog lanca. Članovi ove porodice desaturaza, zaslužnih za biosintezu ω -3 i ω -6 PUFA, predominantno su zastupljeni kod algi, biljaka i gljiva, ali također su prisutni i u nižim životinjama (npr. nematoda *C. elegans*) i protistima, međutim nisu prisutne kod odvedenijih životinja, uključujući i čovjeka. $\Delta 12$ desaturaza kao supstrat najčešće koristi oleinsku kiselinu (C18:1, ω -9), pri čemu nastaje α -linolna kiselina (C18:2, ω -6), dok $\Delta 15$ desaturaza uvodi treću dvostruku vezu u linolnu kiselinu pri čemu nastaje α -linolenska kiselina (C18:3, ω -3) [11].

c) Desaturaze prednjeg kraja: članovi ove porodice desaturaza zaslužne su za uvođenje dodatne dvostruke veze između postojeće dvostruke veze i karboksilnog kraja masne kiseline i predominantno su zastupljene u odvedenijim životinjskim vrstama, posebno kralješnjacima, uključujući i čovjeka. Najzastupljenije su $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaze, koje kao početni supstrat najčešće koriste PUFA: linolnu (C18:2, ω -6) i α -linolensku kiselinu (C18:3, ω -3), te zajedno sa skupinom elongaza, koje također koriste iste PUFA kao supstrat, sudjeluju u sintezi kompleksnijih dugolančanih PUFA: npr. arahidonske (AA, C20:4, ω -6), dokosaheksaenske (DHA, C22:6, ω -3) ili eikosapentaenske kiseline (EPA, C20:5, ω -3).

d) Desaturaze sfingolipida ili sfingolipid- $\Delta 4$ desaturaze: ove desaturaze uvode dvostruku vezu u lanac dugolančanih sfingolipida, međutim za razliku od gore navedenih desaturaza, ove desaturaze uvode dvostruku vezu u *trans* konfiguraciji.

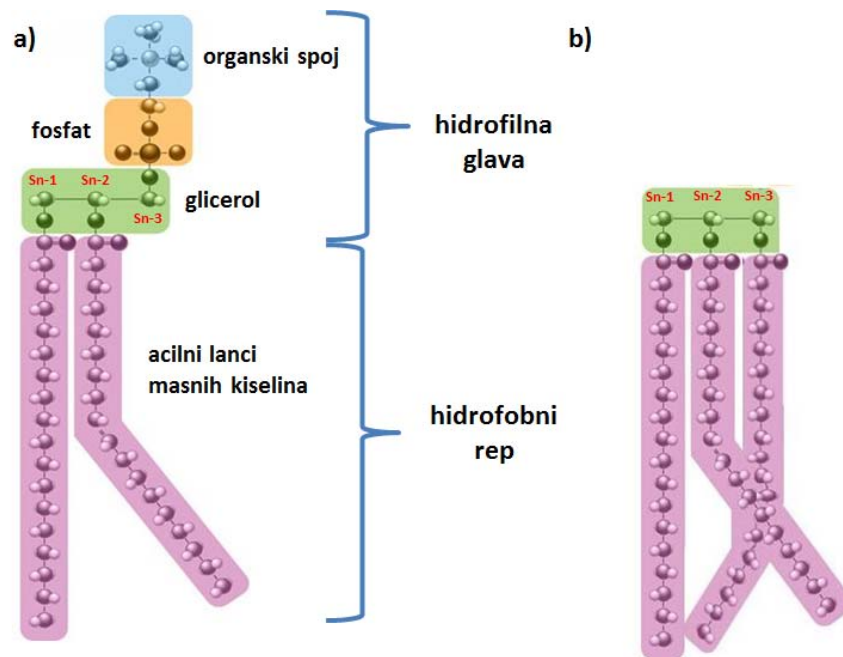


Slika 3. Shematski prikaz putova sinteze nekih od najvažnijih PUFA u biološkim sustavima

1.1.3 BIOLOŠKA FUNKCIJA PUFA

PUFA se u biološkim sustavima najvećim djelom nalaze u vezanom obliku kao sastavni dijelovi glicerolipida. U glicerolipide se ubrajaju svi lipidi koji kao osnovnu molekulu sadrže glicerol, a dijele se u dvije osnovne skupine: glicerofosfolipide i neutralne glicerolipide ili gliceride [10]. Glicerofosfolipidi ili fosfolipidi su osnovne strukturne i funkcionalne građevne jedinice bioloških membrana te su ujedno i najzastupljenija klasa membranskih lipida [18]. Sastavljeni su od molekule glicerola na koju je spojena molekula fosfata (na sn-3 poziciji) i dvije kovalentno vezane molekule masnih kiselina (sn-1 i sn-2 pozicija) (slika 3a). Molekula fosfata može vezati i određenu organsku skupinu koja se obično

koristi za klasifikaciju fosfolipidnih razreda (npr. kolin ili etanolamin itd.). Triacilgliceridi (TAG) su neutralni lipidi, a sastavljeni su od tri molekule masnih kiselina koje su esterskim vezama spojene na molekulu glicerola (na sn-1, sn-2 i sn-3 poziciji). U stanici TAG imaju ulogu pričuve masnih kiselina u svrhu proizvodnje energije ili sinteze novih glicerofosfolipida za izgradnju biomembrana, a također služe kao molekule za detoksifikaciju, odnosno uklanjanje potencijalno štetnih masnih kiselina iz sustava bioloških membrana (slika 3b) [19] TAG ne ulaze u sastav bioloških membrana, već se u stanici nalaze unutar odjeljaka u obliku lipidnih kapljica (engl. lipid droplets) [20].



Slika 3. Shematski prikaz glicerofosfolipida (a) i triacilglicerida (b). Za razliku od glicerofosfolipida kojima fosfat ili organska molekula daju ionski naboj, triacilgliceridi su neutralni (bez naboja). Modificirano prema Nature education (www.nature.com/scitable), 2010.

Fosfolipidi su amfipatične molekule i u vodenom mediju teže agregaciji sa svojim hidrofolbnim dijelovima dalje od vode te svojim hidrofilnim dijelovima, koji se, ako nose naboj, u dodiru s vodom stabiliziraju hidratacijom. Fosfatna skupina sa supstituentima čini polarni dio molekule, tzv. hidrofilnu glavu, dok acilni lanci masnih kiselina čine nepolarni dio, tzv. hidrofolbni rep (Slika 3). Fosfolipidi se u vodenom mediju mogu samoorganizirati u liposome ili vezikule, tvorevine od dva sloja u kojima su hidrofilne glave okrenute prema vanjskom vodenom mediju, dok su hidrofolbni repovi usmjereni prema unutrašnjosti lipidne čestice. Pritom hidrofolbni repovi dva susjedna lipidna sloja nisu kovalentno povezani, iako su

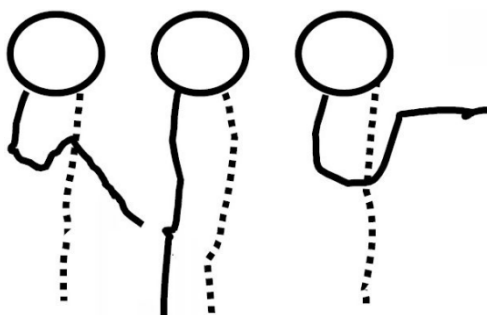
u međusobnom kontaktu. Ova struktura lipidnog dvosloja čini osnovu bioloških membrana [21, 22]. Osim fosfolipida u sastav membranskih lipida eukariotskih organizama još spadaju i steroli (npr. ergosterol kod kvasca ili kolesterol kod čovjeka), te dugolančani sfingolipidi. Ukupno, lipidi čine 30 do 80% masenog udjela bioloških membrana. Preostali dio čine proteini (20 do 60%) i ugljikohidrati (0 do 10%) [8]. Proteini su puno veći od molekula lipida i, iako sličnog masenog udjela, lipidnih molekula je puno više u membrani. Integralni membranski proteini mogu u potpunosti prolaziti kroz membranu (transmembranski proteini) ili mogu biti „uronjeni“ u samo jednu polovicu lipidnog dvosloja, odnosno orijentirani prema unutarnjoj ili vanjskoj strani stanice ili organela.

1.1.3.1 PUFA i biomembrane

Membranski sustavi stanica i njihovih unutarstaničnih organela su metabolički najaktivnija mjesta u stanici, budući su odgovorni za esencijalne stanične procese poput selektivne propusnosti, prijenosa signala, održavanja ionskih gradijenata, sinteze i transporta proteina i lipida, proizvodnje energije (ATP), procesa endocitoze i egzocitoze [1]. Kako bi ispunile ove brojne funkcije, membrane moraju imati svojstvo dinamičnosti i prema modelu „tekućeg mozaika“ biološke membrane predstavljaju dvodimenzionalni tekući matriks koji ima svojstvo lateralnog pokretanja svih svojih sastavnih dijelova u ravnini membrane [22]. Međutim, membrane nisu homogene u svom sastavu i postoji nejednaka raspodjela lipida i proteina, kako unutar jednog sloja, tako i između membranskih dvosloja [23, 24]. Ovakva heterogena organizacija bioloških membrana u specijalizirane mikrodomene s različitim fizikalnim i funkcionalnim karakteristikama posljedica je širokog spektra različitih lipida i proteina sa specifičnim svojstvima [24].

Međutim, kakvu ulogu imaju PUFA u stanici? PUFA u sastavu glicerofosfolipida su esencijalni konstituenti membrana u većini eukariotskih stanica, premda postoje organizmi poput kvasca (*S. cerevisiae*) kojima je za normalno funkcioniranje membrana dovoljno prisustvo jednostruko nezasićenih masnih kiselina (eng. monounsaturated fatty acids, MUFA) [15, 25]. Postoji niz dobro razjašnjenih fizikalnih parametara koja su specifično svojstvo PUFA, pomoću kojih se najbolje može sagledati njihova biološka važnost u odnosu na MUFA, prvenstveno njihov utjecaj na organizaciju membranskog dvosloja. Jedno od osnovnih svojstava koja se pripisuju PUFA-ma je njihov utjecaj na povećanje fluidnosti odnosno, smanjenje stanja uređenosti membrana. Smatra se da PUFA uvjetuju prijelaz iz

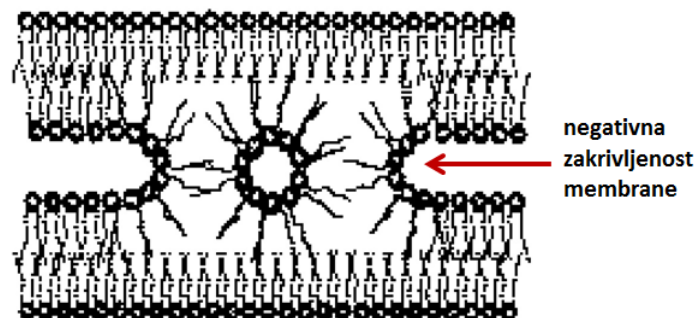
čvrstog visokouređenog stanja koje je karakteristično za sredine zastupljene sa zasićenim masnim kiselinama u fluidno neuređeno stanje, koje je osnovno funkcionalno stanje bioloških membrana [26]. Međutim, za postizanje optimalne fluidnosti membrana, pri temperaturama koje su tipične za većinu organizma na zemlji, dovoljna je prisutnost MUFA. Uvođenje prve nezasićene veze najviše utječe na temperaturu prijelaza membrana (T_m) iz faze čvrstog gela u stanje fluidne neuređenosti [26]. Uvođenje druge dvostruke veze dodatno smanjuje T_m , međutim, dodatne dvostruke veze ne utječu dalje na snižavanje vrijednosti T_m , te time ne povećavaju fluidnost membrana. Za postojanje kompleksnijih PUFA sa 4-6 dvostrukih veza trebala bi postojati druga biološka osnova. Nizom pokusa iz područja biofizike membrana, dokazano je da povećanje stupnja nezasićenosti, odnosno povećanje broja dvostrukih veza u ugljikovodičnom lancu pozitivno utječe na svojstva poput veće propusnosti membrana u odnosu na vodu, i fiziološki važne ione, koja se može protumačiti rjeđim pakiranjem PUFA u membranskom sloju [1, 27, 28]. Predominantna prirodna *cis* konfiguracija PUFA uzrokuje zakrivljenost u ugljikovodičnom lancu, čime se uvodi nered u membranski dvosloj. Unatoč rigidnim svojstvima dvostrukih veza, acilni lanci PUFA sa 4-6 dvostrukih veza imaju visoki stupanj konformacijske fleksibilnosti, te mogu brzo prelaziti između različitih konformacijskih stanja (slika 4) [29].



Slika 4. Shematski prikaz tri moguća konformacijska stanja acilnog lanca DHA (puna linija) u sastavu fosfolipida. Modificirano prema Feller i *sur.*, 2002. [29].

Povećana konformacijska fleksibilnost PUFA direktno utječe na elastičnost membrana te dopušta puno veću kompresibilnost membranskih lipida, što je biološki važno za interakciju s brojnim membranskim proteinima, odnosno njihovu funkciju. Ova fleksibilnost varira ovisno o broju i položaju dvostrukih veza te dužini ugljikovodičnog lanca [30-32]. Npr. glicerofosfolipidi koji sadrže arahidonsku kiselinu (AA, 20:4, -6) pokazuju puno veću

elastičnost od onih koji sadrže dokosaheksaensku kiselinu (DHA, 22:6, ω -3) [2]. Dalje, pokazano je da PUFA u odnosu na MUFA puno bolje zadržavaju konformacijsku slobodu u širem rasponu temperatura, što im svakako daje prednost prilikom prilagodbe na promjenu temperature [26]. Jedno od bitnih svojstava PUFA, koje je također posljedica njihove konformacijske slobode je uvođenje stresa u zakrivljenost membrana (eng. *curvature stress*). Drugim riječima, PUFA pogoduju uvođenju negativne zakrivljenosti i inverziji membranskih fosfolipida, svojstvu koje je bitno za membranske procese poput endocitoze i egzocitoze, odnosno stvaranja membranskih vezikula ili fuzije membrana (slika 5) [26].



Slika 5. Primjer fuzije membrana; PUFA u sastavu fosfolipida imaju važnu ulogu u svim procesima u kojima dolazi do spajanja ili odvajanja membrana, budući da potiču negativnu zakrivljenost membrana i pridonose inverziji membranskih lipida, koji su ključni faktori u navedenim procesima. Modificirano prema Hazel, 1995. [26].

Također, PUFA su direktno odgovorne za stvaranje lateralnih membranskih mikrodomena (eng. *lipid rafts*) bogatih sterolima i sfingolipidima [33]. Steroli (npr. kolesterol) spadaju među najzastupljenije lipide u biološkim membranama, a jedna od njihovih važnih uloga je uvođenje fluidnosti u membranske regije bogate zasićenim lancima masnih kiselina ili dugolančanim nezasićenim lancima u *trans* konfiguraciji, kojima su bogati sfingolipidi. PUFA pokazuju steričku odbojnost prema sterolima, što rezultira formiranjem heterogenih domena unutar membrana koje su bogate PUFA-ma i siromašne sterolima (tekuće neuređeno stanje) i lateralnim domenama koje su bogate sterolima i sfingolipidima, a siromašne PUFA-ma (tekuće uređeno stanje) [2, 34].

1.1.3.2 Raznolikost PUFA

Morske alge spadaju u rijetke organizme na Zemlji koje imaju mogućnost *de novo* sinteze gotovo cijelog spektra biološki relevantnih PUFA, što se objašnjava njihovom evolucijskom prilagodbom na život u hladnom okolišu [10]. Međutim, usporedbom različitih domena živog svijeta, postoje velike razlike u vrstama PUFA koje su esencijalne za strukturu i funkciju bioloških membrana (npr. odvedenije biljke sintetiziraju samo kratkolančane PUFA (većinom linolnu α -linolensku, dok im dugolančane PUFA nisu potrebne za funkciju membrana) [11]. U višestaničnim organizmima poput čovjeka, postoji velika razlika u zastupljenosti PUFA (vrsta i ukupnih količina) ovisno o vrsti stanica, odnosno tkiva i organa [35, 36]. Osim toga, na razini pojedine stanice postoji značajna razlika u zastupljenosti PUFA između različitih tipova membrana (mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, Golgijevog aparata, nuklearne i stanične membrane), ali također i između dva membranska sloja [37-39]. Ova raznolikost distribucije različitih vrsta PUFA upućuje na njihovu specifičnu biološku ulogu, koja do sada nije dovoljno dobro objašnjena, a također podrazumijeva i postojanje specifičnih staničnih mehanizama odgovornih za takvu organizaciju PUFA.

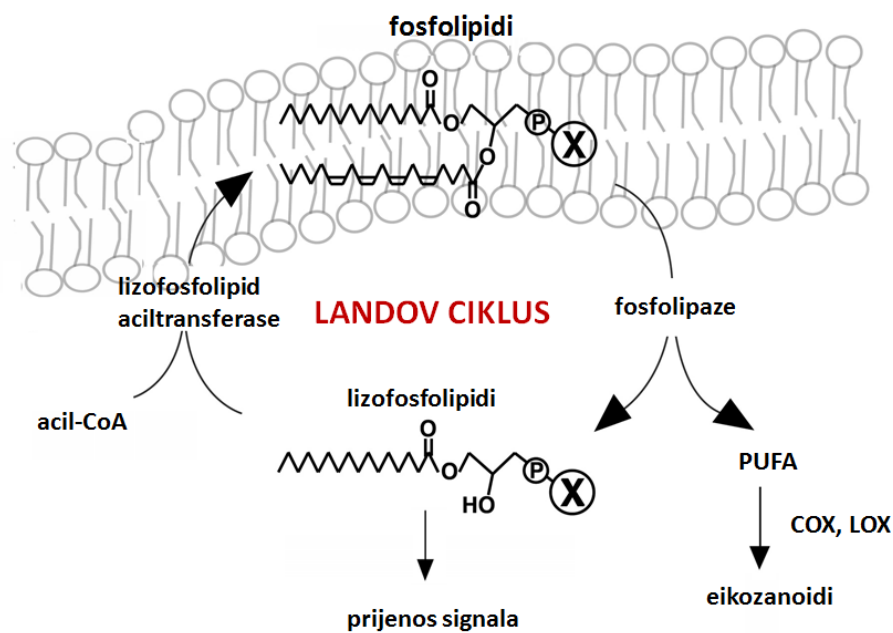
1.1.3.3 PUFA i čovjek

Za razliku od većine protista, algi, gljiva i biljaka koji su sposobni sintetizirati *de novo* sve potrebne masne kiseline uključujući i PUFA, za većinu odvedenijih životinjskih vrsta su PUFA esencijalne i u organizam se unose hranom većinom biljnog podrijetla [40]. Čovjek, kao i većina odvedenijih životinja, nije sposoban sintetizirati *de novo* ω -3 i ω -6 PUFA, te su kod njih linolna (18:2, ω -6) i α -linolenska (18:3, ω -3) kiselina esencijalne [11]. Kako bi iskoristio njihov puni potencijal čovjek posjeduje ~~svi~~ Δ 6 desaturaza i srodni elongaza pomoću kojih, od linolne i γ -linolenske kiseline sintetizira fiziološki važne dugolančane PUFA, od kojih su najzastupljenije arahidonska (20:4, ω -6), eikosapentaenska (20:5, ω -3) i dokosaheksaenska (22:6, ω -3) kiselina [40, 41]. Unesene hranom, PUFA se raspoređuju u sve stanice ljudskog organizma, iako postoje određene stanice poput neuralnih stanica, te stanica mrežnice oka i spermija koje su posebno bogate dugolančanim PUFA-ma (posebno DHA), neophodnim za održavanje njihovih specijaliziranih membranskih procesa [2]. Mehanizmi koji kontroliraju ovakvu distribuciju PUFA nisu do kraja razjašnjeni, no čini se da je visoki udio PUFA u ovim stanicama velikim djelom reguliran na razini gena, dok god

je zadovoljena barem minimalna potreba za esencijalnim PUFA-ma unesenim hranom [6, 36]. Nadalje, sustav $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaza je tkivno specifičan; npr. neuroni imaju relativno nisku aktivnost ovih desaturaza i prvenstveno ovise o unosu dugolančanih PUFA iz okolnih astrocita i jetrenih stanica. Međutim, neuralne stanice imaju selektivne mehanizme kojima zadržavaju visoki udio DHA u svojim lipidima, sprečavajući njihov izlazak iz stanice, dok se npr. AA slobodno izlučuje iz stanica neurona [42, 43]. Za razliku od spomenutih stanica, većina stanica ljudskog organizma tolerantnija je prema promjenama u sastavu PUFA u membranskim lipidima i podložnije su njihovim varijacijama ovisno o prehrani. Iako je većina pokusa o utjecaju prehrane do sada napravljena na animalnom modelu (miševi i štakori), moguća je usporedba s čovjekom, budući i miševi i štakori posjeduju isti sustav desaturaza kao čovjek, te moraju uzimati esencijalne ω -3 i ω -6 PUFA prehranom [44, 45]. Navedenim pokusima pokazano je da prehrana ima minimalan utjecaj na ukupni udio PUFA, koji je većinom konstantan u različitim tipovima stanica i organa, te neovisno o prehrani dobro reguliran na razini stanice (dok god je zadovoljena minimalna potreba za esencijalnim PUFA-ma). Međutim, pokazano je da prehrana ima veliki utjecaj na promjenu udjela ω -3 i ω -6 PUFA u membranama [36]. Sastav acilnih lanaca membranskih lipida najvećim djelom je reguliran preko sustava enzima aciltransferaza, fosfolipaza i transacilaza, uključenih u puteve sinteze te remodeliranja membranskih lipida u procesu deacilacije i reacilacije (Landov ciklus) (slika 6) [46-48]. Veliki dio enzima uključenih u ove procese ne razlikuje ω -3 od ω -6 PUFA te se povećanjem unosa određene klase PUFA hranom, povećava njihov udio u ukupnom sastavu PUFA u membranskim lipidima [36]. Dakle, premda stanice velikim dijelom kontroliraju ukupni udio PUFA na razini gena, PUFA unesene prehranom imaju značajan utjecaj na ravnotežu između ω -3 i ω -6 PUFA, i posljedično tome mogu utjecati na važne fiziološke procese u organizmu. Također, budući su sustavi desaturaza i elongaza tkivno specifični, u određenim stanicama u kojima je izražena niska aktivnost $\Delta 5$ desaturaza, PUFA s 20 i više C-atoma (AA, EPA i DHA) unesene hranom imaju puno važniju ulogu nego npr. linolna i α -linolenska [49].

Kod čovjeka, ali i drugih odvedenijih eukariotskih organizama, PUFA u sastavu fosfolipida mogu biti metabolizirane enzimima skupnih naziva ciklooksigenaze (COX) i lipooksigenaze (LOX), što dovodi do proizvodnje signalnih molekula eikozanoida (prostaglandina, tromboksana i leukotrena), medijatora upalnih procesa, imunološkog odgovora, vazokonstrikcije (regulacije krvnog tlaka), hormonalne regulacije, senzibilizacije neurona na bol, kontrakcije mišića, te rasta stanica [50-52]. Slobodne PUFA mogu sudjelovati

direktno u regulaciji ekspresije gena; npr. vezanjem na nuklearne receptore koji kontroliraju proteine SREB (engl. *sterol regulatory element binding proteins*, SREBP), koji se vežu na sterolom regulirani element, PPARs (engl. *peroxisome proliferator activated receptors*), receptore za aktivaciju proliferacije peroksisoma i jetreni X receptor. PUFA su također uključene u bitne stanične procese poput diferencijacije stanica i replikacije DNA [53, 54].



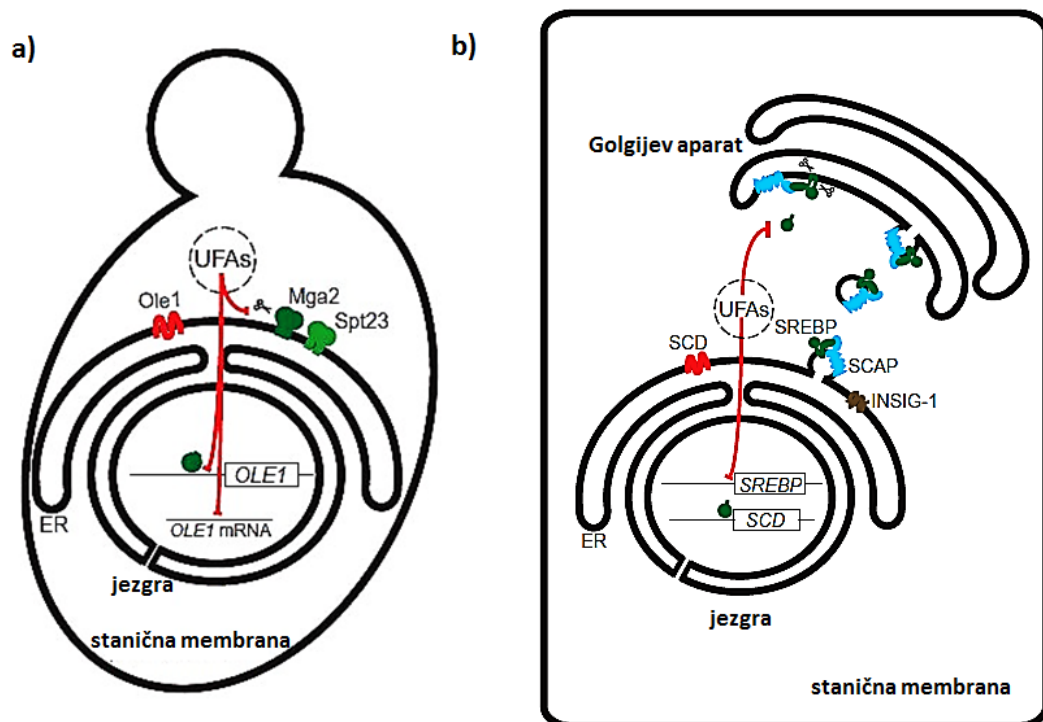
Slika 6. Landov ciklus: shematski prikaz putova regulacije sastava acilnih lanaca u membranskim glicerofosfolipidima kod čovjeka. Fosfolipaze hidroliziraju estersku vezu acilnog lanca, pri čemu nastaju slobodne masne kiseline (uključujući i PUFA) i lizofosfolipidi (fosfolipidi s jednim acilnim lancem). Slobodni lanci PUFA mogu služiti kao supstrati za proizvodnju eikozanoida. Od lizofosfolipida se dalje u procesu reacilacije sintetiziraju novi glicerofosfolipidi pomoću masnih kiselina vezanih na koenzim A (acil-CoA) djelovanjem enzima aciltransferaza. Lizofosfolipidi također mogu napustiti membranu i služiti kao signalne molekule. Modificirano prema Hishikawa i *sur.*, 2008. [55].

1.1.4. MEHANIZMI REGULACIJE DESATURACIJE MEMBRANA

Mikroorganizmi, biljke i životinje reguliraju sintezu (P)UFA tijekom promjena okoliša i uvjeta života, te ovisno o prehrani [56]. Na primjeru poiklotermnih organizama, pokazano je da je adaptacija na hladnije uvjete okoliša popraćena značajnim povećanjem udjela nezasićenih masnih kiselina (npr. kod riba povećava se prvenstveno udio dugolančanih PUFA), kako bi se osigurala fluidnost i elastičnost membrana, koja omogućava normalne stanične fiziološke procese, usporedive s onim pri višim temperaturama [57]. Homeostaza nezasićenih masnih kiselina u većini organizama kontrolirana je na sličnom principu, regulacijom transkripcije gena za desaturaze putem povratne sprege. U ovaj proces uključni su specijalizirani membranski senzori koji putem prijenosa signala reguliraju transkripciju staničnih desaturaza [58]. (P)UFA utječu na fizikalna svojstva membrana, te djeluju kao negativne signalne molekule koje inhibiraju ekspresiju desaturaza.

Kod čovjeka (i općenito životinja), koji imaju sustave $\Delta 9$, $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaza (i njihovih izoformi), kontrola njihove transkripcije regulirana je preko RIP signalnog puta u kojem sudjeluju proteini SREBP (slika 6b) [59, 60]. Protein SREBP ima dvije izoforme: SREBP-1 i SREBP-2, koji su kodirani sa dva različita gena. SREBP-1 ima dvije izoformne varijante (SREBP-1a i SREBP-1c), koje nastaju alternativnim prekrajanjem mRNA prepisane s istog gena. Unatoč preklapajućim ulogama ovih proteina, SREB2 je dominantan prilikom transkripcijske kontrole gena biosinteze i unosa sterola, dok izoformna varijanta SREBP-1c ima dominantniju ulogu u transkripcijskoj regulaciji gena odgovornih za sintezu i desaturaciju masnih kiselina [60]. Izoformna varijanta SREBP-1a kontrolira podjednako oba transkripcijska puta. Proteini SREBP, koji su predominantno locirani u membranama ER-a formiraju kompleks s proteinom SCAP (engl. SREBP cleavage activating protein). SREBP-SCAP kompleks je u interakciji s trećim proteinom ovog signalnog puta, INSIG-1 ili -2. U slučaju optimalnog sastava sterola i (P)UFA, SREBP-SCAP kompleks je u interakciji s proteinom INSIG-1/2 i signalni put je inhibiran. Međutim, u slučaju potrebe za (P)UFA-ma ili sterolima, protein SCAP prolazi konformacijske promjene svoje regije za prepoznavanje sterola (SSD, engl. sterol sensing domain), čime se kompleks SREBP-SCAP odvaja od proteina INSIG-1/2. Protein INSIG-1/2 se zatim izlučuje iz ER-a, te biva razgrađen ubikvitin-proteosomalnim putem, kako bi se spriječilo ponovno formiranje kompleksa sa SCAP-SREBP. Kompleks SCAP-SREBP se transportira u Golgijev aparat, gdje protein SREBP biva proteolitički modificiran, otpuštajući aktivnu topivu domenu [61, 62]. Ovako procesiran dio

proteina SREBP putuje u jezgru gdje se veže na elemente SRE (engl. sterol regulatory elements) koji aktiviraju transkripciju gena za unos i sintezu sterola, odnosno (P)UFA. Sama aktivacija RIP signalnog puta regulirana je preko sterola kao ključne molekule, ali sastav masnih kiselina, posebno PUFA također neposredno utječe na organizaciju sterola u membranama i na taj način njegovu interakciju sa kompleksom SREBP-SCAP, iako točni mehanizam nije potpuno razjašnjen. Međutim, poznato je da (P)UFA u ER-u inhibiraju proteolitičku razgradnju proteina INSIG-1 [63]. Prehrana bogata (P)UFA-ma inhibira aktivaciju ovog signalnog puta, odnosno inhibira transkripciju gena za desaturaze. Također, pokazano je da povećani sadržaj ((P)UFA snižava količinu proteina SREBP na razini translacije, odnosno snižava njegovu mRNA u stanici, što predstavlja dodatni mehanizam inhibicije desaturaza [58]. Inhibitorski učinak nezasićenih masnih kiselina na ekspresiju desaturaza povećava se sa stupnjem nezasićenosti masne kiseline (brojem dvostrukih veza).



Slika 6. Mehanizmi regulacije kojima stanica kontrolira optimalan sastav nezasićenosti masnih kiselina u membranama kod kvasca (a) i čovjeka (b). UFA (engl. *unsaturated fatty acids*) su nezasićene masne kiseline, u koje naravno spadaju i PUFA. Modificirano prema Aguilar, 2006. [58].

Iako kvasac ne proizvodi PUFA, MUFA čine 70-80% ukupnih kvašćevih masnih kiselina, a sintetiziraju se od zasićenih acil-CoA prekursora u ER-u, djelovanjem jedine kvašćeve desaturaze Ole1 [15]. MUFA su esencijalne kod kvasca, budući mutant *ole1Δ* nije

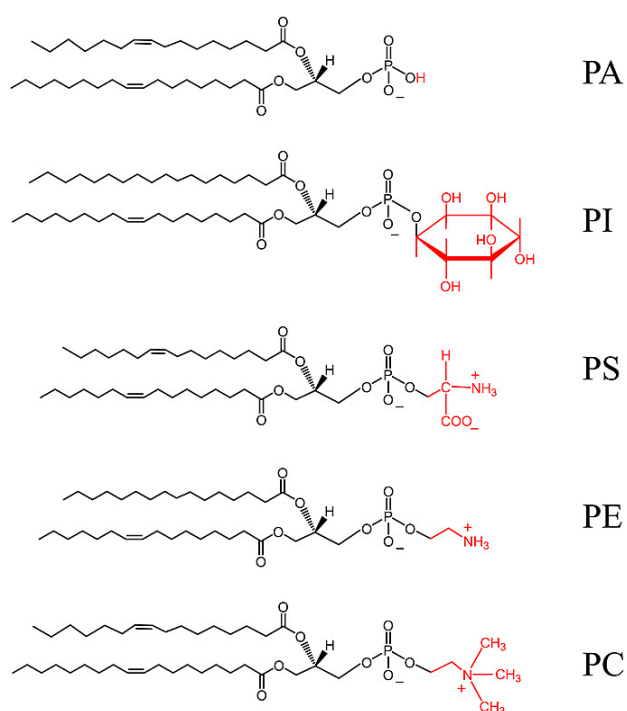
vijabilan, ukoliko medij nije suplementiran egzogenim MUFA-ma [15]. Ekspresija gena *OLE1* precizno je kontrolirana na razini transkripcije, ovisno o izvoru šećera, koncentraciji kisika i prisutnosti masnih kiselina u hranjivom mediju [15]. Mehanistički slično odvedenijim sisavcima, kod kvasca, kontrola nezasićenosti masnih kiselina regulirana je pomoću efektorskih proteina smještenih unutar membrana ER-a, Spt23 i Mga2 (slika 6a) [64]. U slučaju nedostatka nezasićenih masnih kiselina, funkcionalni dimeri ova dva proteina obilježavaju se ubikvitinom djelovanjem E3 ubikvitin ligaze Rsp5, što promiče njihovo cijepanje u proteasomu 26S, pri čemu nastaju aktivirani proteini s njihovog N-kraja, koji se dalje transportiraju u jezgru gdje promoviraju transkripciju gena *OLE1* [65]. U slučaju nedostatka jednog od ova dva proteina, drugi funkcionalni protein može ga zamijeniti, međutim protein Mga2 je esencijalan u uvjetima adaptacije na hladnoću i hipoksiju, pri kojima dolazi do snažne indukcije gena *OLE1* [66]. Povećani unos (P)UFA iz okolnog medija, inhibira proteolitičko cijepanje proteina Spt23, dok je inhibicija transkripcije gena *OLE1* u slučaju proteina Mga2 regulirana nizvodno od njegove proteolitičke razgradnje. [67]. Regulacija kvaščeve desaturaze Ole1 također je kontrolirana direktnom destabilizacijom njegove mRNA od strane (P)UFA, pri čemu također sudjeluje protein Mga2 [68].

1.1.5. RAZREDI FOSFOLIPIDA

Varijacije hidrofilnih grupa u kombinaciji s varijacijom masnih kiselina u acilnim lancima lipida omogućavaju postojanje više od 1000 različitih vrsta glicerofosfolipida unutar većine eukariotskih stanica [37, 69]. Osnovni biološki princip, po kojem je struktura podređena funkciji, implicira na određenu evolucijsku prednost, kao posljedicu tako širokog spektra različitih lipidnih vrsta. Fosfolipidi imaju višestruku ulogu u stanici. Osim što osiguravaju selektivnu barijeru stanice i njenih organela, fosfolipidi pružaju i potencijal za procese pupanja, fisije i fuzije membrana, koji su esencijalni za staničnu diobu, reprodukciju i membranski transport u procesima endocitoze i egzocitoze [37]. Također, fosfolipidi osiguravaju membranski matriks za odvijanje širokog spektra metaboličkih procesa, služe stanici kao prvi i drugi glasnici u prijenosu signala, te kao molekularni biljezi u prepoznavanju stanica.

Ovisno o organskoj molekuli (kolin, etanolamin, serin ili inozitol) vezanoj na fosfat na sn-3 poziciji glicerola, fosfolipidi se klasificiraju u četiri osnovna razreda: fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) i fosfatidilinositol (PI) [70, 71]. U

glicerofosfolipide se još ubrajaju i fosfatidil-glicerol (PG), kardiolipin (CL) i fosfatidilna kiselina (PA) [72-74]. PA, koja uz dva acilna lanca (sn-1 i sn-2) ima vezan samo fosfat (sn-3), nije važan strukturni membranski fosfolipid. CL je karakterističan za membrane protista, a u eukariotskim organizmima isključivo je smješten u unutrašnjim membranama mitohondrija (slično kao i prekursor u njegovoj sintezi PG), što je vjerojatno evolucijska posljedica njihovog endosimbiotskog podrijetla [75]. Razredi PC i PE spadaju u zwiter-ionske lipide budući imaju dvije ionizirajuće skupine, jednu anionsku i jednu kationsku. Za razliku od njih razredi PS i PI spadaju u anionske lipide, što je posljedica viška anionskih skupina, koje ovim molekulama daju negativan naboj [76].



Slika 7. Shematski prikaz najzastupljenijih razreda glicerofosfolipida u eukariotskim stanicama, koji se međusobno razlikuju o ovisno vrsti organske molekule koja je vezana na fosfat. Preuzeto iz Henry i *sur.*, 2012. [71].

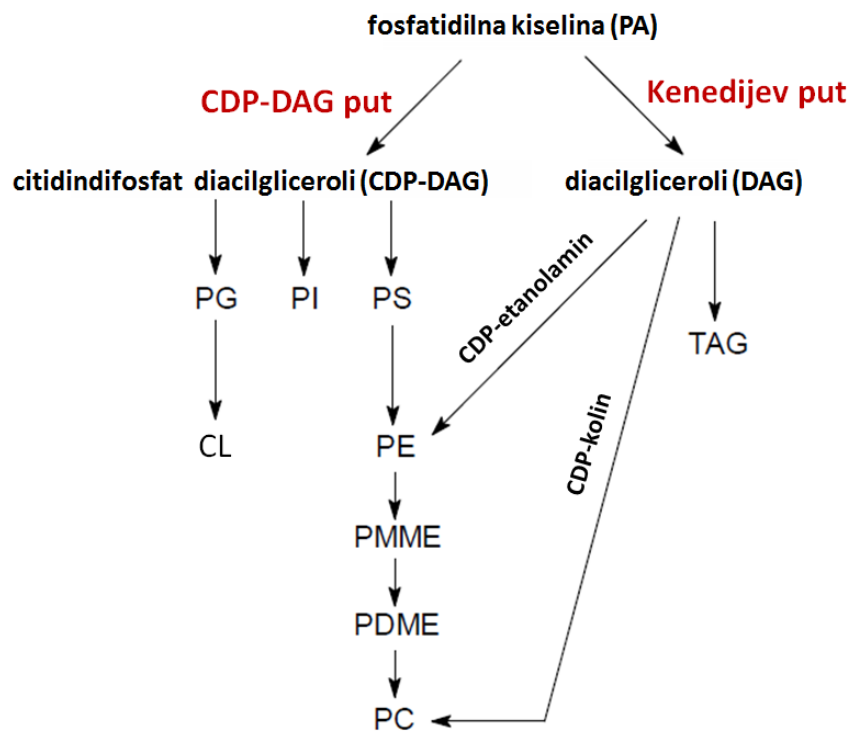
Kod većine eukariotskih organizama zwiter-ionski razredi (PC i PE) čine 60 - 85% ukupnog udjela svih fosfolipida, s time da u pravilu PC ima više od 50%, dok PE čine 20 – 50% u ukupnom udjelu. Anionskih razreda (PS i PI) ima manje te zajedno čine 15 - 30% ukupnih glicerofosfolipida, s time da su PS u većini slučajeva zastupljeniji od razreda PI [3, 77, 78]. Međutim, udio pojedinih razreda fosfolipida može značajno varirati između različitih organizama, te također ovisno o tipu stanice kod višestaničnih organizama. Npr., u stanicama

kvasca PI mogu činiti i do 20% ukupnog udjela svih fosfolipida, dok je u stanicama većine odvedenijih sisavaca njihov udio oko 1% [70, 77, 79, 80]. Nadalje, kod sisavaca, stanice mozga imaju oko 50% udjela PE, dok jetrene stanice imaju oko 20%. Također, kod sisavaca postoji specifična distribucija PUFA među lipidnim razredima [51, 77]. Na primjer, kod čovjeka, AA je posebno zastupljena u razredima PI i PE, dok je DHA zastupljenija unutar razreda PS i PE. U usporedbi s ostalim organima DHA je posebno zastupljena u acilnim lancima fosfolipida mozga i srca, dok je npr. AA podjednako zastupljena među acilnim lancima PI u svim stanicama [51].

1.1.5.1. Putovi sinteze glicerolipida

Kod svih eukariotskih organizama, ER je osnovno mjesto u stanici gdje se odvija biosinteza gotovo svih lipida ili njihovih osnovnih prekursora, dok konačnu formu/modifikaciju lipidi mogu dobiti naknadno u ciljnoj membrani ili tijekom prijenosa na ciljno mjesto (Golgijev aparat, endosom) [37, 81-83]. Osnovni prekursor u sintezi svih lipida je PA. Do sinteze PA dolazi vezanjem lanaca masnih kiselina (djelovanjem aciltransferaza) na molekulu glicerol-3-fosfata ili dihidroksiaceton-fosfata, koji nastaju u stanici tijekom glikolize [71]. Iz PA se dalje sintetiziraju svi ostali razredi glicerolipida i to preko dva osnovna puta: Kenedijevog puta i CDP-DAG puta (slika 8) [84]. Kod sisavaca, sinteza zwitterionskih razreda fosfolipida, PC i PE, ide većinom preko Kenedijevog puta u kojem se PA prvo enzimatski defosforilira u diacilglicerol (DAG) [84, 85]. Nadalje, na sn-3 poziciju DAG enzimatski se vežu aktivirane organske skupine CDP-kolin (CDP, citidin-difosfat) ili CDP-etanolamin, pri čemu nastaju funkcionalni razredi PC i PE. DAG na ovom putu služe također i kao prekursori za sintezu neutralnih triacilglicerida (TAG). Kod kvasca, Kenedijev put također je osnovni izvor sinteze razreda PC i PE, pod uvjetom da je hranjivi medij suplementiran egzogenim kolinom i etanolaminom, budući da endogenim putem stanica kvasca dolazi do ova dva spoja u procesu obrtanja već postojećih lipida [86]. CDP-DAG put podrazumijeva enzimatsku reakciju citidin-trifosfata (CTP) i PA, pri čemu nastaju CDP-DAG. CDP-DAG dalje služe kao prekursori u sintezi anionskih razreda fosfolipida: PI, PG, CL, a kod kvasca i PS. Kod čovjeka razred PS nastaje enzimatskim konverzijama razreda PC i PE, zamjenom njihove organske molekule za serin [84, 87]. Nadalje, kod kvasca, sinteza razreda PC i PE, velikim djelom regulirana je preko puta CDP-DAG (pogotovo u mediju bez suplementiranog kolina i etanolamina), prilikom čega dolazi do enzimatske konverzije razreda

PS u PE, a uzastopnim koracima metilacije PE mogu biti konvertirani u PC. Ovakav mehanizam konverzije PS u razrede PE i PC sačuvan je i kod sisavaca [71, 84]. Također, jedan od bitnih mehanizama u sintezi fosfolipida je i njihovo neprestano obrtanje, odnosno stvaranje novih lipida od već postojećih, proces koji se konstantno odvija u stanici. U ovom procesu, enzimi skupnog naziva fosfolipaze i lipidne fosfataze reguliraju razgradnju postojećih lipida, pri čemu dolazi do hidrolize i odvajanja organske molekule od molekula DAG ili PA, čime ponovno nastaju prekursori u sintezi glicerolipida [71, 84].



Slika 8. Putovi sinteze osnovnih razreda glicerolipida u stanici kvasca. PMME-fosfatidilmonometilenetanolamin, PDME – fosfatidil-dimetilenetanolamin.

1.1.5.2. Transport i distribucija fosfolipida

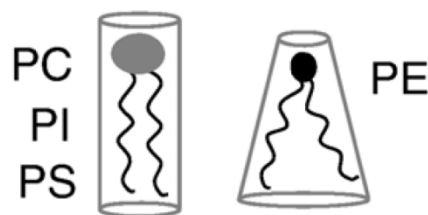
Funkcija lipida određena je njihovom lokalnom koncentracijom koja varira između organela, dva sloja pojedine membrane, ali također i unutar lateralne ravnine jednog membranskog sloja, međutim, mehanizmi kojima stanica regulira ovakvu specifičnu distribuciju lipida nisu ni približno razjašnjeni [88]. Poznato je da se većina fosfolipida od

mjesta sinteze na ER-u distribuiraju sekretornim putem pomoću vezikula (direktno iz ER-a ili putem Golgijevog aparata), koje se procesom fuzije spajaju s ciljnim membranama [37, 83, 88]. Također, moguć je i obrnuti (retrogradni) prijenos lipida iz sustava staničnih membrana endosomalnim putem. Međutim, dok je u membranama ER-a raspored fosfolipida uglavnom simetričan ili nasumičan, u transportnim vezikulama dolazi do specifične preraspodjele lipidnih razreda, koji svoju završnu distribuciju dobivaju unutar ciljne membrane [37, 89]. Ovakva raspodjela lipida, pri kojoj dolazi do obogaćivanja citoplazmatske strane membrane anionskim i amino fosfolipidima (PE, PS, PI, PA), te obogaćivanja ekstracitoplazmatske strane membrane (topologijski ekvivalent luminalnoj strani membrane organela) razredom PC i sfingolipidima, ubikvitarno je svojstvo većine eukariotkih stanica [90]. Spontani transverzalni prijenos lipida između dva sloja membrane, koji bi omogućio ovakvu asimetričnu raspodjelu, energijski je nepovoljan zbog steričkog odbijanja hidrofilne glave i hidrofobne unutrašnjosti membranskog dvosloja i spontano se u stanicama odvija vrlo sporo. Stoga, eukariotske stanice posjeduju sustav enzima skupnih naziva flipaze i flopaze, koje reguliraju transverzalni prijenos lipida između membranskih dvosloja, uz utrošak energije ATP-a [91]. Ovisno o tipu prijenosa, ovi enzimi dijele se u dvije osnovne skupine: P4 potporodicu P-tip ATP-aza, koje su odgovorne za prijenos lipida s ekstracitoplazmatske ili lumenalne strane na citoplazmatsku stranu (flipaze) i ABC (eng. *ATP-binding cassette*) transportere, odgovorne za obrnuti prijenos lipida u suprotnom smjeru. Svaka od ove dvije skupine transportera ima više članova, koji se međusobno razlikuju ovisno o mjestu djelovanja (tipu membrane) i supstratnoj specifičnosti za pojedine lipide razrede [92, 93].

Zaključno, održavanje optimalnog sastava različitih vrsta membranskih lipida i njihovih acilnih lanaca esencijalno je za membranske procese, a regulira se na razini biosinteze lipida, njihove međusobne interkonverzije, vezikularnog transporta (sekrecija i endosomalni transport), transverzalnog prijenosa, reguliranim obrtom te remodeliranjem acilnih lanaca (Landov ciklus). Stanica je u stanju, navedenim mehanizmima modulirati sastav pojedinih lipidnih razreda i njihovih vrsta u membranama ovisno o trenutnim potrebama stanice i vanjskim podražajima.

1.1.5.3. Biološka funkcija pojedinih lipidnih razreda

Iako dosadašnje spoznaje dobro objašnjavaju specifičnu ulogu brojnih lipidnih razreda, cjelokupna slika o ulozi kompletnog lipidnog spektra nije do kraja razjašnjena [94]. Zbog svoje gotovo cilindrične geometrijske strukture, PC imaju svojstvo spontanog formiranja dvosloja što ih čini najvažnijim strukturnim elementom biomembrana i objašnjava njihov visoki udio (slika 8) [95-97]. Većina molekula PC ima barem jedan (višestruko)nezasićeni acilni lanac u cis konfiguraciji, što osigurava fluidnost membrana pri fiziološkim temperaturama. Nadalje, PC su uključeni u specifične biološke procese poput prijenosa signala te služe kao izvor lipidnih signalnih molekula poput lizofosfatidilkolina (LPC), PA i DAG [98, 99]. Za razliku od PC, PE imaju stožastu geometrijsku strukturu (Slika 8), koja je posljedica relativno male veličine njihove polarne „glave“ te nemaju svojstvo spontanog formiranja membranskog dvosloja, iako u kombinaciji s PC, lako ulaze u sastav bioloških membrana. Zbog ovakve strukture, PE uvode stres u zakrivljenost membrana, a to svojstvo je bitno u fiziološkim procesima stanice, poput stanične diobe (citokineze), fisije (spajanja staničnih membrana) ili pupanja [100, 101]. Osim ovih procesa, svojstvo uvođenja stresa u zakrivljenost membrana pomaže pri interakciji membranskih proteina s lipidnim matriksom te njihovim smještajem i aktivnosti u membranskom dvosloju. Uvođenje PUFA u sastav acilnih lanaca PE, dodatno uvodi stres u zakrivljenost membrana i jedan je od mehanizama regulacije kojima stanica kontrolira navedene membranske procese [86, 102, 103].



Slika 8. Za razliku od ostalih razreda (PC, PI i PS), PE zbog svoje relativno male hidrofилne glave imaju stožastu strukturu, što je važno za njihovu biološku funkciju. Modificirano prema de Kroon, 2007. [97].

U biomembranama, PS se nalaze predominantno u formi soli, s time da PS pokazuju poseban afinitet prema ionima kalcija (Ca^{2+}) [104, 105]. Anionski karakter PS značajan je za njihovu biološku funkciju, te značajno pridonosi membranskim procesima ovisnim o elektrostatskim interakcijama. Visoka koncentracija anionskih lipida rezultira akumulacijom

negativnog površinskog naboja na koji se mogu vezati polikationski proteini, što je jedan od mehanizama preusmjeravanja određenih proteina do ciljnih mjesta u membrani. Kod sisavaca, PS imaju ključnu ulogu u aktivaciji proteina kinaze C (PKC), važnog staničnog enzima uključenog u prijenos signala, a također su potrebni za funkcioniranje Na^+/K^+ ATPaze. Nadalje, PS imaju važnu ulogu u procesu koagulacije krvi, pri čemu dolazi do redistribucije PS-a na ekstracitoplazmatsku stranu membranskih vezikula, a također su uključeni i u aktivaciju protrombina, važnog proteina u ovom procesu [105, 106]. PS također sudjeluju u regulaciji apoptoze, gdje dolazi do njihove relokalizacije na ekstracitoplazmatsku stranu stanične membrane, što služi za prepoznavanje apoptotičnih stanica od strane makrofaga [107]. PS preko kompleksa s Ca^{2+} sudjeluju u odlaganju minerala, prilikom osteogeneze. Zaključno, PS su puno manje zastupljeni u ukupnom udjelu glicerofosfolipida u odnosu na razrede PC i PE, međutim pokazuju uključenost u puno veći spektar specifičnih fizioloških procesa i interakcija s proteinima, što otkriva njihovu puno širu ulogu od čisto strukturne regulacije bioloških membrana [105].

Iako su PI zastupljeni u niskom udjelu kod većine eukariotskih organizama, ovaj razred glicerofosfolipida ima važnu ulogu u regulaciji važnih bioloških procesa koje su velikim dijelom sačuvane od kvasca do čovjeka [108-110]. PI su uključeni u gotovo sve aspekte stanične fiziologije poput uspostavljanja polarnosti stanica, određivanja identiteta membrana, dinamike citoskeleta, regulacije stanične adhezije i pokretljivosti stanica te njihove diobe [80]. Slično kao i PS, ovaj razred posljedično svom negativnom naboju ima bitnu ulogu u membranskim procesima reguliranim elektrostatskim interakcijama. PI u stanici služe kao specijalizirana mjesta na membranama za interakciju s brojnim efektorskim molekulama i proteinima koji sudjeluju u prijenosu signalnih kaskada. Također PI služe kao prekursori u proizvodnji sekundarnih lipidnih glasnika [110]. U stanici postoji kompleksan sustav kinaza i fosfataza, koji su zaduženi za reverzibilne procese fosforilacije i defosforilacije molekule inozitola na molekuli PI, pri čemu nastaju različite izoforme PI (ovisno o broju i mjestu fosforilacije), koje se skupno nazivaju polifosfoinozitidi [111]. Vremenski i mjesno ovisna proizvodnja i obrat različitih polifosfoinozitida (na principu fosforilacije i defosforilacije) ima ključnu ulogu u specijaliziranim putovima prijenosa signala [112]. Također, pojedine izoforme PI služe kao jedinstveni lipidni biljezi koji daju identitet unutarstaničnim organelima u procesima prepoznavanja i interakcije s ostalim staničnim komponentama. Interkonverzija različitih izoformi PI također je bitna za precizan vezikularan transport i fuziju sa ciljnim membranama.

1.2. PUFA i LIPOTOKSIČNOST

Iako su PUFA esencijalne za normalno funkcioniranje membranskih procesa i staničnih funkcija kod većine eukariotskih stanica, u određenim uvjetima PUFA mogu biti štetne za stanicu/organizam.

1.2.1. RAVNOTEŽA ω -3 i ω 6 PUFA

Kod čovjeka, poremećaj ravnoteže između ω -3 i ω -6 PUFA ima štetne posljedice za organizam, što je povezano sa suvremenom zapadnjačkom prehranom, u kojoj je povećan sastav ω -6 PUFA [113, 114]. Za normalno funkcioniranje organizma bitan je njihov pravilan omjer u staničnim membranama. Ove dvije klase PUFA, zbog različitih fizikalnih svojstava drugačije moduliraju sastav membranskih mikrodomena, te služe kao prekursori za proizvodnju različitih signalnih molekula koje aktiviraju specifične receptore i utječu na ekspresiju gena [2]. Međutim, većina enzima koji sudjeluju u metaboličkim procesima regulacije PUFA, kao na primjer enzimatska oksidacija (COX, LOX) ili remodeliranje acilnih lanaca lipida (lipaze, aciltransferaze), nemaju svojstvo selektivne diskriminacije ω -3 i ω -6 PUFA [36, 52]. Posljedično tome, ove dvije klase PUFA su u međusobnoj kompeticiji kao supstrati za navedene enzime, te povećanje udjela jedne klase PUFA, u odnosu na drugu, značajno utječe na povećanje produkata njihove metaboličke konverzije, najčešće sa suprotnim posljedicama za stanicu. Eikozanoidi (prostaglandini, leukotreni i tromboksani) i autokoidi (rezolvini, dokosatrieni i neuroprotektini) signalne su molekule koje nastaju enzimatskom oksidacijom ω -3 PUFA (EPA i DHA) te pokazuju protu-upalna i zaštitna svojstva, dok enzimatskom oksidacijom ω -6 PUFA (naročito AA) prvenstveno nastaju pro-upalni eikozanoidi koji su uključeni u propagaciju različitih patoloških stanja organizma [2, 51, 113, 115]. Poremećaj ravnoteže ω -3 i ω -6 masnih kiselina i njihovih metabolita uzrokuje pojavu različitih patoloških procesa kod čovjeka, te su posljedično tomu i ciljevi istraživanja mnogih farmaceutskih tvrtki usmjereni prema ovom problemu.

1.2.2. PUFA I OKSIDACIJSKI STRES

Pojavom kisika na Zemlji došlo je do razvoja aerobnog metabolizma, koji koriste većina današnjih organizama za dobivanje potrebne energije. Evolucijski, prijelaz na aerobni

metabolizam značio je prekretnicu u razvoju živog svijeta, budući je omogućio puno učinkovitiji sustav generiranja energije za razliku od anaerobnog metabolizma [116]. Međutim, kao posljedica takvog načina života, dolazi do stvaranja nusprodukata i intermedijera u metabolizmu kisika, reaktivnih kisikovih čestica (eng. *reactive oxygen species*, ROS) (tablica 2) [4]. Većina ROS-a su kratkoživući i visokoreaktivni slobodni radikali, sposobni za brze reakcije sa staničnim makromolekulama (DNA, proteini, lipidi i ugljikohidrati). Kao posljedica tih reakcija dolazi do njihovog oksidacijskog oštećenja i samim time negativnih posljedica za stanicu [117-120]. U fiziološkim, normalnim uvjetima, stvaranje ROS-a s jedne strane i njihovo uklanjanje antioksidacijskim mehanizmima organizmima s druge strane je u ravnoteži [121]. Međutim, u određenim uvjetima može doći do narušavanja ove ravnoteže u smjeru povećane proizvodnje ROS-a i takvo stanje definira se kao oksidacijski stres.

Tablica 2. Reaktivne kisikove čestice.

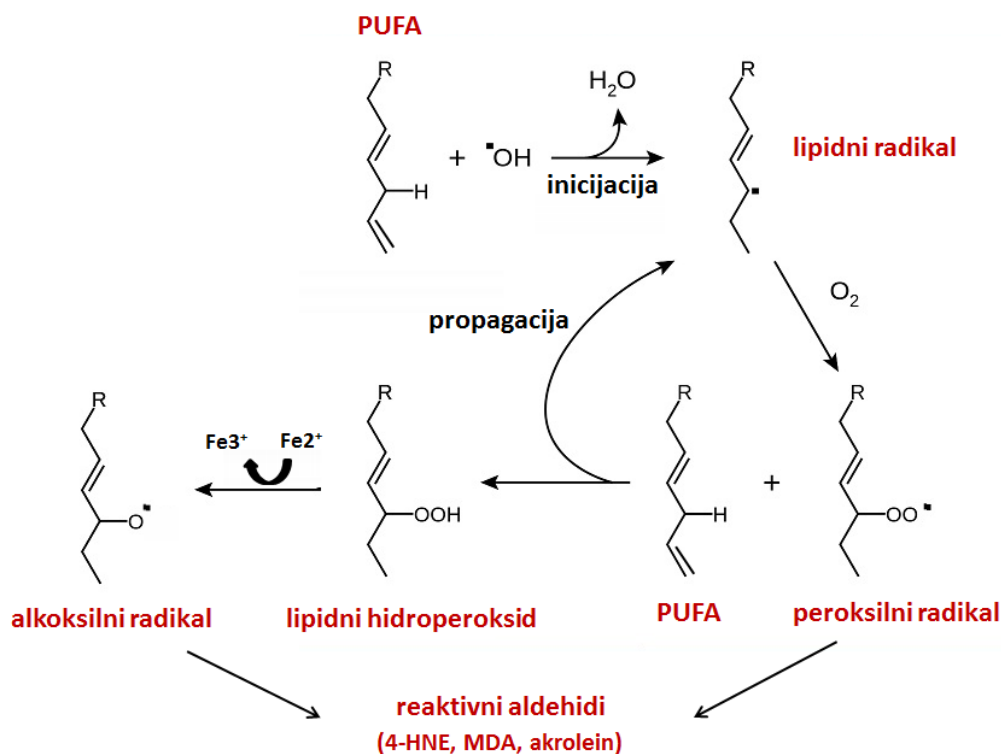
Slobodni radikali	Neradikali
superoksidni, $O_2^{\cdot -}$	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, $\cdot OH$	hipoklorna kiselina, $HOCl$
peroksilni, RO_2^{\cdot}	ozon, O_3
alkoksilni, RO^{\cdot}	singletni kisik, $^1\Delta_g O_2$
hidroperoksilni, HO_2^{\cdot}	peroksinitrit, $ONOO^{\cdot -}$

Jedan od fundamentalnih svojstava PUFA, posljedica je njihove građe, odnosno postojanja sustava višestrukih dvostrukih veza, zbog kojih PUFA lako stupaju u reakciju s reaktivnim kisikovim tvarima [3]. Ova reaktivnost je posljedica postojanja alilnog vodika u pentadienskoj strukturi ($-CH=CH-CH_2-CH=CH-$) unutar ugljikovodičnog lanca svih PUFA. Proces mogu započeti različiti inicijatori: toplina, svjetlo, ionizirajuće zračenje, prijelazni metali, kemijski inicijatori. Inicijacijalnom reakcijom dolazi do apstrakcije vodikovog atoma iz metilenske $-CH_2-$ grupe bilo kojom dovoljno reaktivnom česticom, pri čemu nastaje radikal lipida. Kisik iz zraka adira lipidni radikal stvarajući peroksilni radikal, koji započinje lančanu reakciju u procesu nazvanom lipidna peroksidacija [5, 8, 122]. Mehanizam reakcije

prikazan je na slici 9. Treba naglasiti da su posebno reaktivni i hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$), alkoksilni radikal ($\text{RO}\cdot$) i peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$). Oksidacijska oštećenja PUFA u sastavu membrana imaju potencijalno štetne učinke na stanicu, te ukoliko su obimna, mogu dovesti do narušavanja strukture membranskih lipida i integriteta staničnih membrana. Kao konačni produkti procesa lipidne peroksidacije nastaju reaktivni aldehidi, od kojih su do sada najbolje opisani i okarakterizirani 4-hidroksinonenal (4-HNE), malondialdehid (MDA) i akrolein [123]. 4-HNE i MDA nastaju kao produkti lipidne peroksidacije ω -6 PUFA. Za razliku od ROS-a, reaktivni aldehidi su puno stabilniji, međutim mogu poput ROS-a reagirati sa svim biološkim makromolekulama i time biti potencijalno štetni za stanicu. Oksidacijski stres i lipidna peroksidacija povezani su s procesom starenja i imaju podlogu u različitim patofiziološkim stanjima kod čovjeka, kao na primjer neurodegenerativnim bolestima, dijabetesom, bolestima jetre i tumorima [7, 9, 124, 125].

1.2.2.1 Izvori ROS-a u organizmu

Jedan od najvećih endogenih izvora ROS-a u stanici su mitohondriji, budući se u njima metabolizira oko dvije trećine O_2 koji uđe u organizam [126]. U procesu oksidativne fosforilacije dolazi do prijenosa elektrona putem respiratornog lanca, na unutrašnjoj membrani mitohondrija, do konačnog primatelja, O_2 , koji se reducira u vodu, a kao prijelazni intermedijer u tom procesu stvara se superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [127]. Ovo je velikim djelom kontrolirani proces i tako nastali $\text{O}_2^{\cdot-}$ u sustavu citokroma bc_1 (kompleks III) brzo se dalje prevodi u vodu. Međutim, pretpostavlja se da pri fiziološkim uvjetima oko 1-2% ovako nastalog $\text{O}_2^{\cdot-}$ nekontrolirano „iscuri“ iz sustava, i time predstavlja potencijalnu opasnost za stanicu, a u mitohondriju stvaranju $\text{O}_2^{\cdot-}$ također pridonosi i sustav NADH dehidrogenaze (kompleks I). $\text{O}_2^{\cdot-}$ se dalje može enzimatskom konverzijom prevesti u vodikov peroksid (H_2O_2), koji u Fentonovoj reakciji lako reagira sa željezom u reduciranom stanju (Fe^{2+}), pri čemu nastaje hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$), najreaktivniji ROS u biološkim sustavima. Fentonova reakcija je poznata autooksidacijska reakcija u kojoj sudjeluju prijelazni metali (npr. željezo, bakar) i kao inicijatori i kao katalizatori. Ovi metali su česti proteinski kofaktori u biološkim sustavima. Prijelazni metali mogu se naći u manjim koncentracijama u obliku iona u stanici, dovoljnim da mogu inicirati nastajanje slobodnih radikala Fentonovom reakcijom bilo reakcijom s vodikovim peroksidom bilo lipidnim hidroperoksidima [128].



Slika 9. Shematski prikaz mehanizma lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je autokatalitički proces budući peroksilni radikal može reagirati sa susjednim PUFA-ma i uzrokovati daljnju propagaciju oksidacije PUFA. Kao konačni produkti ovog procesa nastaju potencijalno štetni reaktivni aldehidi.

Osim u mitohondrijima, u stanici postoji cijeli niz enzimskih reakcija u kojima dolazi do redukcije kisika, prilikom čega nastaju njegovi intermedijeri superoksidni anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$) [129]. Značajan izvor ROS-a, kao posljedice ovakvih enzimskih reakcija predstavljaju peroksisomi i ER. Na primjer, u ER-u, ROS nastaju prilikom hidroksilacije endogenih i egzogenih supstrata (lijekova, steroida, karcinogena), djelovanjem enzima iz porodice citokrom P-450 (CYP) ili kod desaturacije masnih kiselina. U peroksisomima do stvaranja ROS-a, prvenstveno H_2O_2 , dolazi prilikom razgradnje masnih kiselina u procesu β -oksidacije. Metabolizam lipida također je izvor slobodnih radikala, prilikom nastanka prostaglandina iz arahidonske kiseline. Ostali primjeri ovakvih reakcija uključuju enzime: monoamin oksidazu na vanjskoj membrani mitohondrija, ksantin oksidazu, sustav NADH-citokrom b5 i citokrom P-450 reduktaza u mikrosomima i NADPH oksidazu u neutrofilima [129].

1.2.3. MEHANIZMI OBRANE OD OKSIDACIJSKOG STRESA

Kako bi se obranile od štetnih učinaka reaktivnih kisikovih tvari, stanice su razvile obrambene mehanizme. Ovi mehanizmi antioksidacijske obrane dijele se na enzimatske i neenzimatske [121, 130].

1.2.3.1. Neenzimatski antioksidacijski sustavi

U neenzimatske obrambene sustave spadaju male molekule koje su u stanici različito distribuirane ovisno o svojim hidrofilnim ili hidrofobnim svojstvima. Ovi antioksidansi služe kao nespecifični čistači radikala i djeluju na principu doniranja elektrona reaktivnim kisikovim tvarima, pri čemu ROS prelazi u reducirano stanje koje nije štetno za stanicu, a sami antioksidansi se u tom procesu oksidiraju.

Svakako jedan od najvažnijih hidrofilnih neenzimatskih antioksidanasa u eukariotskim stanicama je glutation (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin, GSH), koji se ujedno i smatra glavnim čuvarem unutarstaničnog oksido-redukcijskog stanja [130-132]. Kao donor elektrona u procesu redukcije, GSH koristi svoju sulfhidrilnu skupinu cisteina (tiolnu skupinu ili -SH), pomoću koje neutralizira reaktivne kisikove tvari, te također sudjeluje u „popravku“ oštećenih staničnih molekula (npr. reducira oksidirane proteine i na taj ih način vraća prvobitno stanje). GSH se u tom procesu oksidira i najčešće formira disulfidnu vezu s drugom oksidiranom molekulom GSH dajući oksidirani oblik glutaciona, GSSG. GSH je i kod kvasca vrlo važna antioksidacijska molekula; na primjer, mutanti kvasca bez gena za sintezu glutaciona su osjetljivi na razne oksidanse, kao što su vodikov peroksid, menadion, kadmij, metilglioksil [133-135]. Uz glutation i poliamini masnih kiselina, poput spermina i spermidina, sudjeluju u antioksidacijskoj zaštiti kod kvasca. Vitamin C (L-askorbinska kiselina) je važan hidrofilni stanični antioksidans, za čovjeka esencijalan i unosi se hranom (voće i povrće), premda ga većina drugih organizama može sama sintetizirati [136]. Vitamin C je i esencijalan kofaktor u brojnim metaboličkim procesima poput sinteze kolagena, karnitina i neurotransmitera. Oksidirani oblik vitamina C može se ponovno reducirati pomoću glutaciona i NADPH u antioksidacijsku formu. Kod kvasca njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena, ali kvasac sintetizira eritroaskorbinsku kiselinu koja ima karakteristike slične vitaminu C [137]. U važne eukariotske neenzimatske antioksidanse također se ubrajaju i sustavi glutaredoksina (GRX) i tioredoksina (TRX) [138]. Ova dva funkcionalno i strukturalno slična antioksidanasa

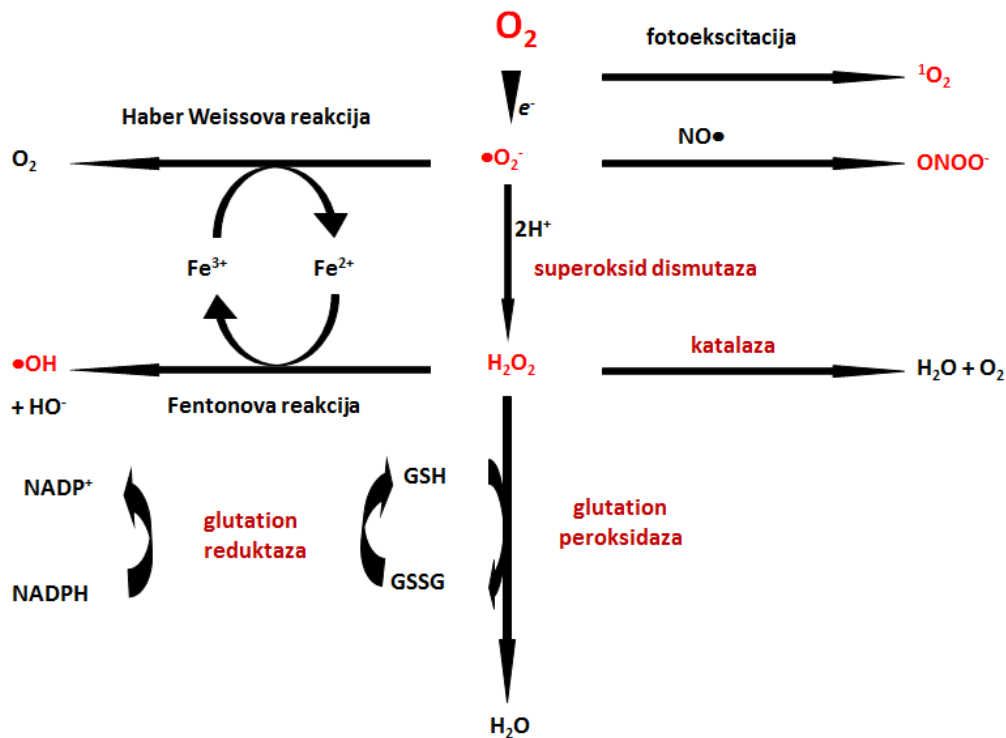
sintetiziraju se u svim stanicama, a za njihovo antioksidacijsko djelovanje zaslužne su sulfhidrilne skupine dva cisteina, karakterističnog motiva Cys-X-X-Cys. Ovi antioksidansi većinom sudjeluju u redukciji oksidiranih disulfidnih veza proteina. Tijekom redukcije ciljnih molekula ovi antioksidansi formiraju unutar molekulske disulfidne veze između dva cisteina u aktivnom mjestu (-S-S-). Osnovna razlika između ova dva sustava je u tome da se oksidirani oblik TRX-a enzimatski reducira nazad u aktivni oblik pomoću enzima tioredoksin reduktaze i NADPH, dok se oksidirani oblik GRX-a reducira nazad u aktivno stanje pomoću glutationa, neovisno o enzimu. Kod čovjeka još treba navesti mokraćnu kiselinu, kao antioksidans u krvi.

Najvažniji hidrofobni neenzimatski antioksidansi u biološkim sustavima su koenzim Q i vitamin E [139, 140]. Koenzim Q, koji se sintetizira u svim eukariotskim stanicama ima važnu ulogu u prijenosu elektrona u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Prilikom prijenosa elektrona dolazi do njegove konstantne oksidacije i redukcije, na čemu se zasniva i njegova antioksidacijska uloga. Osim u mitohondrijima, koenzim Q je prisutan u svim staničnim membranskim sustavima, gdje je važna njegova uloga u prekidu procesa lipidne peroksidacije, budući koenzim Q reagira s lipidnim radikalima i lipidnim peroksidima. Za regeneraciju oksidirane forme koenzima Q zaslužna je NADPH ovisna reduktaza, ali i glutation. Drugi važan hidrofobni antioksidans je vitamin E (α -tokoferol), koji je kod čovjeka esencijalan nutrijent i unosi se hranom većinom biljnog podrijetla. Zbog svoje pretežno membranske lokalizacije vitamin E je također važan faktor u zaštiti stanice od oksidacije PUFA i terminaciji lipidne peroksidacije. Oksidirani oblik vitamina E regenerira se sustavom vitamina C i koenzima Q. U važne hidrofobne antioksidanse kod čovjeka se još ubrajaju i estrogeni i karotenoidi.

1.2.3.2. Enzimatski antioksidacijski sustavi

Enzimatski antioksidacijski sustavi složeniji su od neenzimatskih te uključuju niz kaskadnih reakcija koje dovode do potpune detoksifikacije ROS-a. Najpoznatiji eukariotski enzimatski sustav detoksifikacije ROS-a, je sustav superoksid dismutaza i katalaza, prikazani na slici 10. Superoksid dismutaza (SOD), koja katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u vodikov peroksid ima nekoliko izoenzima, među kojima su mitohondrijska (MnSOD) i citoplazmatska (Zn/CuSOD) [141, 142]. Za razliku od kvasca, čovjek ima i treću, ekstracelularnu superoksid dismutazu (SOD3). Katalaza je enzim koji djeluje nizvodno od SOD-a i razgrađuje vodikov peroksid do vode i kisika [143]. Kod kvasca postoje dvije

izoforme ovog enzima, citoplazmatska, katalaza T, koju kodira gen *CTT1*, i peroksisomalna, katalaza A, kodirana genom *CTA1* [144]. Peroksisomalna katalaza inducirana je uzgojem stanica na mediju bogatom masnim kiselinama što se objašnjava povećanom β -oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, a samim time i povećanim stvaranjem ROS-a. Citoplazmatska katalaza inducirana je vodikovim peroksidom, ali i toplinskim, osmotskim stresom te izgladnjavanjem.



Slika 9. Shematski prikaz putova nastanka ROS-a u stanici i njihovog uklanjanja od strane enzimatskih antioksidanasa.

Enzimi koji nadopunjuju i regeneriraju neenzimatske antioksidanse (npr. glutation i tioredoksin), također spadaju u antioksidacijske obrambene sustave eukariotskih stanica. Enzim glutation reduktaza pomoću NADPH regenerira oksidirani glutation (GSSG), a tioredoksin reduktaza, također uz pomoć NADPH, reducira disulfidnu vezu oksidiranog tioredoksina [145, 146]. Važan sustav enzimatskih antioksidanasa čine enzimi iz porodice glutation peroksidaza (GPX) koji uz pomoć glutationa kataliziraju redukciju hidroperoksida, uključujući i lipidne hidroperoksidge [147]. Enzimi iz porodice glutation-S-transferaza (GST) sudjeluju u detoksifikaciji ksenobiotika i štetnih produkata metabolizma, na način da kataliziraju njihovu konjugaciju s glutationom, a nastali spojevi naknadno se izbacuju iz

stanice [148]. Posebno je važna njihova uloga u procesu detoksifikacije stanice od reaktivnih aldehida nastalih lipidnom peroksidacijom [149]. Dok kod čovjeka porodica GST ima puno članova i izoformi, koji pokazuju tkivnu i supstratnu specifičnost, kvasac ima četiri gena za enzime koji pokazuju aktivnost glutation-S-transferaza (*GTT1*, *GTT2*, *GRX1*, *GRX2*) [150]. Na kraju, važnu ulogu u očuvanju antioksidacijskog statusa stanica imaju enzimi uključeni u regeneraciju glavnog staničnog redukcijskog ekvivalenta NADPH, u pentoza fosfatnom putu [142, 151]. Ključni enzimi puta ovog puta su glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (*ZWFI*), transketolaza (*TKLI*) i ribuloza-5-fosfat epimeraza (*RPEI*), a mutacije u ovim genima čine stanice osjetljivijima na oksidacijski stres.

1.3. KVASAC

1.3.1. KVASAC KAO MODELNI ORGANIZAM

Kvasac je čovječanstvu poznat od davnina u proizvodnji kruha, piva i vina. Danas se metabolizam kvasca koristi u proizvodnji farmaceutskih pripravaka, enzima, različitih okusa te drugih tvari. Kako je njegova upotreba sve češća i raznovrsnija, detaljno su istraženi njegovi fiziološki procesi te metabolizam. Ova istraživanja smjestila su kvasac ne samo u vodeći industrijski mikroorganizam, nego i u vodeći eukariotski model u znanstvenim istraživanjima [152]. Kvasac je prvi eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran, čime su stvoreni preduvjeti za stvaranje banke sojeva kvasca kojima nedostaju pojedini geni [153]. Ovime su pak otvoreni putovi za razvoj novih tehnika pa su tako prvi DNA mikročipovi za analizu transkripcije gena te prvi proteomski čip napravljeni upravo na kvascu [154]. Također, radi jednostavnosti sustava, kvasac postaje sve popularniji model i u temeljnim medicinskim istraživanjima. Neke prednosti kvasca kao eukariotskog modela u znanosti navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Karakteristike kvasca koje ga čine dobrim eukariotskim modelom.

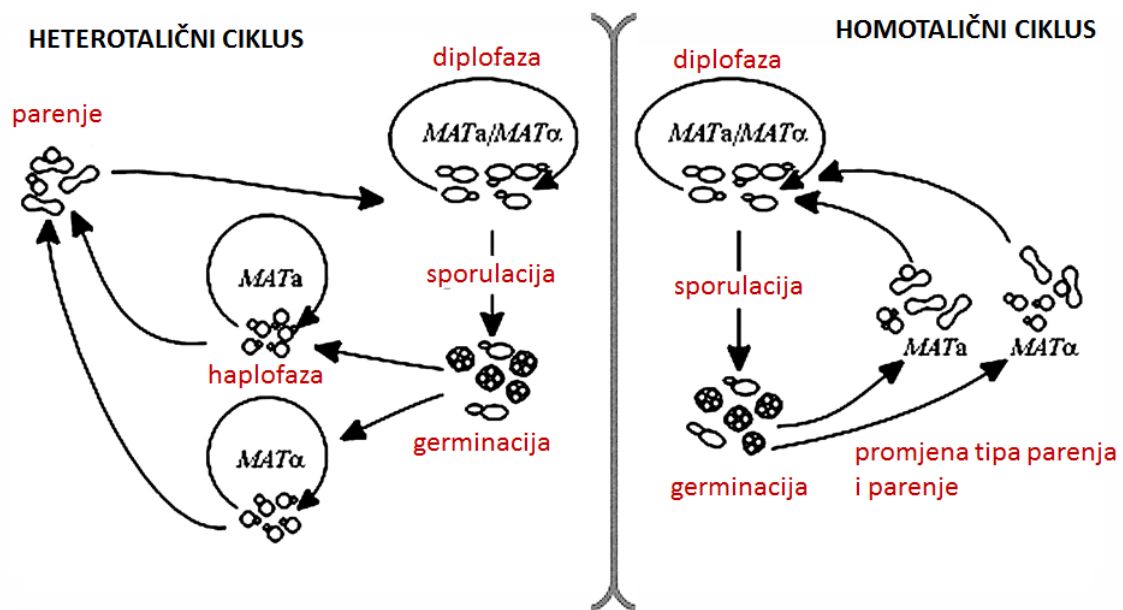
Kvasac kao eukariotski model
Velika očuvanost (homologija) na razini organizacije stanice, gena i staničnih procesa s odvedenijim eukariotkim organizmima, uključujući i čovjeka.
Kratko vrijeme udvostručavanja (oko 1,5 h), vrlo velika gustoće stanica (>10 ⁸ stanica/ml), veliki omjer površina/volumen
Mendelova genetika
Lagana manipulacija genima
Poznata fiziologija
Dobro uspostavljeni vektorski sustavi
Poznati genom od 1996. godine
Kolekcije deletiranih mutanata za sve gene (ako su vijabilni)
DNA čipovi za analizu transkripcije
Potpuni set proteina fuzioniranih na reporterske proteine GFP
Dobro istražene i dostupne mape proteinskih interakcija

1.3.2. BIOLOGIJA KVASCA

Kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, je jednostanični eukariotski organizam koji se u prirodi može nalaziti u dva oblika, haploidnom i diploidnom. Haploidne stanice, nastaju iz diploidnih stanica, mejozom, u procesu sporulacije pri čemu iz jedne diploidne stanice nastaju četiri haploidne stanice (spore), a određuje ih tip parenja, a i α . Proces sporulacije karakterističan je za stresne uvjete poput suše ili nedostatka hrane. Haploidne stanice različitog tipa parenja (a i α) spajaju se u diploidnu stanicu ($a\alpha$). U povoljnim uvjetima i diploidne i haploidne stanice razmnožavaju se mitozom (pupanjem) [155].

Haploidni genom kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, sastoji se od 16 kromosoma, veličine od 200 do 2 200 kb, što ukupno iznosi 12 052 kb. Tip parenja (MAT, eng. Mating type locus), smješten je na trećem kromosomu koji sadrži i „tihe“ gene za oba tipa parenja (lokus HML sadrži tihi gen α , dok lokus HMR sadrži tihi gen a). Haploidne stanice sposobne su mijenjati tip parenja i prema tome razlikujemo homotalične i heterotalične stanice (Slika 10). Naime, homotalične stanice sadrže aktivnu endonukleazu HO koja sudjeluje u

premještanju „kazete“ s HML, odnosno HMR lokusa na MAT lokus koji predstavlja aktivne gene i određuje tip parenja. Tako homotalične stanice izmjenjuju tip parenja svakom generacijom. Heterotalične stanice nemaju aktivnu ovu endonukleazu te ne izmjenjuju tip parenja. Laboratorijski sojevi kvasca su heterotalični kako ne bi došlo do spontanog stvaranja diploida [155].



Slika 10. Životni ciklus homotaličnih i heterotaličnih stanica kvasca.

1.3.3. KVASAC KAO MODEL U ISTRAŽIVANJU METABOLIZMA PUFA I LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Za razliku od većine eukariotskih organizama kvasac nema sustav desaturaza za endogenu proizvodnju PUFA i za normalno funkcioniranje membrana dovoljno mu je prisutnost jednostruko nezasićenih masnih kiselina, koje se sintetiziraju pomoću jedine kvašćeve desaturaze Ole1 (Δ^9 desaturaza) [156]. Štoviše, kvasac ima vrlo jednostavan sastav masnih kiselina, od kojih palmitinska (16:0), palmitoleinska (16:1, ω -7), stearinska (18:0) i oleinska (18:1, ω -9) kiselina čine oko 95% ukupnog udjela acilnih lanaca membranskih lipida. Ovakva, relativno mala raznolikost masnih kiselina, kojom se značajno smanjuje i broj mogućih lipidnih vrsta, čini kvasac atraktivnim i jednostavnim modelnim organizmom u temeljnim istraživanjima putova metabolizma masnih kiselina i lipida te njihove toksičnosti, budući da unatoč jednostavnom sastavu masnih kiselina postoji visoki stupanj očuvanosti

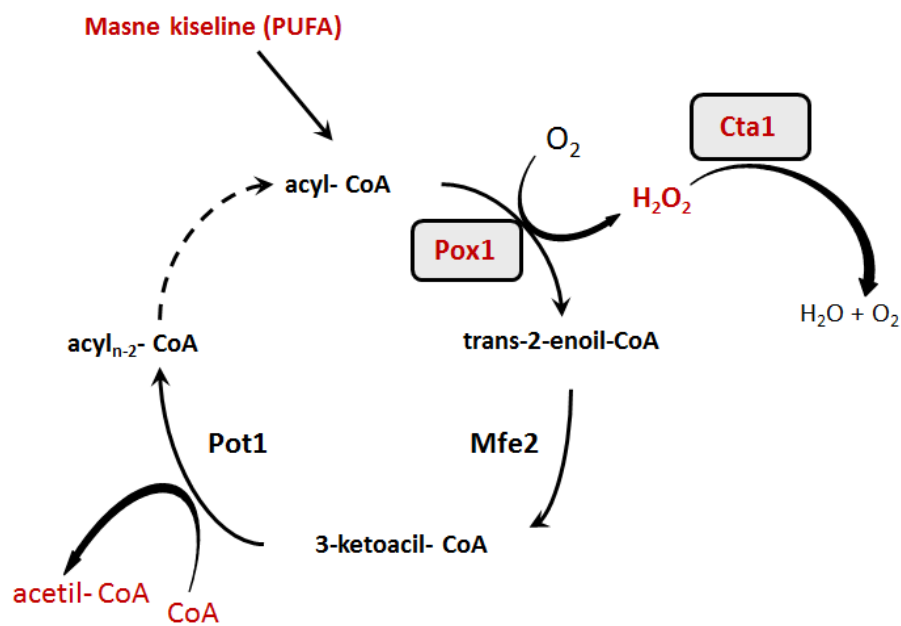
njihovih regulatornih procesa sa čovjekom [85, 157, 158]. Iako kvasac ima mogućnost sinteze svih potrebnih masnih kiselina *de novo*, također je sposoban unijeti u stanicu masne kiseline (uključujući i PUFA) iz okolnog medija, i ugraditi ih u membranske glicerofosfolipide i triacilgliceride [19, 159]. Ovo je do sada bio najčešći pristup u istraživanjima metaboličkih putova regulacije PUFA i učinaka lipidne peroksidacije na modelu kvascu. Međutim, kako bi se izbjegao potencijalno štetan učinak oksidacije PUFA u mediju, u novije vrijeme kreirani su sustavi transgenih kvasca s unesenim genom/ima za desaturaze, koje im omogućavaju endogenu sintezu PUFA [25, 160]. U ovom radu, bit će korišteni sojevi kvasca transformirani genom za $\Delta 12$ desaturazu iz biljke kaučuka (*Hevea brasiliensis*), koji se nalazi pod kontrolom inducibilnog galaktoznog promotora [160].

Dosadašnje spoznaje na ovom modelu kvasca koji ima sustav $\Delta 12$ desaturaze, pokazale su da u inducirajućim uvjetima PUFA čine oko 20% ukupnog udjela masnih kiselina; od čega linolna kiselina čini 12-15%, dok heksadekadienska kiselina čini manju frakciju oko 3-5% u ukupnom udjelu. Također, pokazana je povećana osjetljivost ovog soja na niz oksidacijskih stresora (H_2O_2 , tBH, parakvat) ovisno o prisutnosti PUFA [160]. Kao posljedica tretmana vodikovim peroksidom došlo je do formiranja 4-HNE proteinskih konjugata, čime je pokazano da se ovaj soj može koristiti u istraživanjima učinaka lipidne peroksidacije [160]. Pokazana je i uloga dviju kvašćevih katalaza (citoplazmatske i peroksisomalne) u staničnom odgovoru na prisustvo PUFA. Analiza mikročipovima pokazala je velike promjene na razini transkripcije gena u prisutnosti PUFA, što je ukazalo na specifične procese uključene u adaptaciju stanice kvasca na prisutnost PUFA. Između ostalih, povećanu ekspresiju pokazali su geni uključeni u razgradnju masnih kiselina u procesu β -oksidacije (*POX1*, *SPS19*) i geni uključeni u transport acetil-CoA, koji nastaje razgradnjom masnih kiselina u ovom procesu (*CRC1*, *CAT2*) [161].

1.3.3.1. β -oksidacija

β -oksidacija je proces enzimatske razgradnje lanaca masnih kiselina i pojednostavljeno se može opisati kao proces obrnut od njihove sinteze [161]. Dok prilikom sinteze masnih kiselina dolazi do produživanja ugljikovodičnog lanca u ponavljajućim koracima od po dva ugljikova atoma pomoću acetil-CoA, u procesu β -oksidacije dolazi do skraćivanja lanca, također u ponavljajućim koracima od po dva ugljikova atoma, prilikom čega nastaje acetil-CoA. Osnovna uloga β -oksidacije u stanici je proizvodnja energije,

odnosno acetil-CoA, koji služi kao osnovni prekursor tijekom Krebsovog ciklusa, ali i biosinteze aminokiselina. Također, pokazana je uloga u remodeliranju masnih kiselina, budući su enzimi β -oksidacije ključni u zadnjem koraku skraćivanja lanca tetrakosaheksaenske (24:6, ω -3) kiseline pri čemu nastaje DHA kod čovjeka [11, 162]. Međutim, uloga β -oksidacije u očuvanju stanične homeostaze masnih kiselina i membranskih lipida nije do sada dovoljno istražena [162, 163]. Kvasac predstavlja atraktivan model za izučavanje uloge β -oksidacije u stanici, jer je kod njega ovaj proces isključivo vezan za peroksisome, dok se kod čovjeka β -oksidacija također odvija i u mitohondrijima (slika 11) [164]. Iako je u proces β -oksidacije uključen cijeli niz enzima i reakcija, ključan enzim u ovom procesu, koji regulira prvi i ograničavajući korak razgradnje masnih kiselina kod kvasca je acil-CoA oksidaza (Pox1). Također, tijekom inicijalnog koraka razgradnje masnih kiselina dolazi do redukcije kisika u vodikov peroksid, za čije je uklanjanje zadužena kvaščeva peroksisomalna katalaza A (Cta1) [161].



Slika 11. Shematski prikaz procesa β -oksidacije kod kvasca. U prvom i ključnom koraku djelovanjem enzima acil-CoA oksidaze (Pox1) nastaje vodikov peroksid, za čije uklanjanje je zadužena peroksisomalna katalaza A (Cta1). Acetil-CoA koji nastaje razgradnjom masnih kiselina se dalje transportira u mitohondrije, gdje se koristi za proizvodnju energije ili biosintetske procese.

1.4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj rada bio je istražiti metaboličke putove masnih kiselina i lipida u procesu adaptacije stanica kvasca na prisutnost PUFA. Također, koristeći kolekciju jednostrukih mutanata cilj je bio identificirati „esencijalne“ gene koji štite stanicu od toksičnosti PUFA u uvjetima oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije, u svrhu razumijevanja sličnih patoloških procesa u eukariota.

Budući da su prijašnji rezultati analize genske ekspresije mikročipovima ukazali na ulogu procesa β -oksidacije u staničnom odgovoru na endogenu sintezu PUFA, u radu je ispitan utjecaj PUFA na rast, indukciju antioksidacijske zaštite te osjetljivost na egzogeni oksidacijski stres jednostrukih mutanata bez dva važna gena u procesu β -oksidacije: mutantu kojem nedostaje acil-CoA oksidaza (*pox1*) i mutantu bez peroksisomalne katalaze A (*cta1*). Također, kao kontrola korišten je mutant bez citoplazmatske katalaze T (*ctt1*), koji štiti citoplazmu od vodikovog peroksida.

Kako bi se ispitao utjecaj PUFA na promjene u metabolizmu lipida, napravljena je detaljna kvantifikacija osnovnih razreda glicerofosfolipida i triacilglicerida te njihovih vrsta u tri različita vremena od početka akumulacije PUFA u stanici kvasca. Također, ispitano je da li suplementacija oleinskom kiselinom (koja služi kao prekursor za sintezu ω -6 PUFA), u kvascu s $\Delta 12$ desaturazom dovodi do povećane endogene proizvodnje linolne kiseline. Nadalje, cilj je bio ispitati da li povećani udio linolne kiseline utječe na promjene u sastavu membranskih lipida i triacilglicerida, u odnosu na stanice kvasca sa nižim udjelom PUFA.

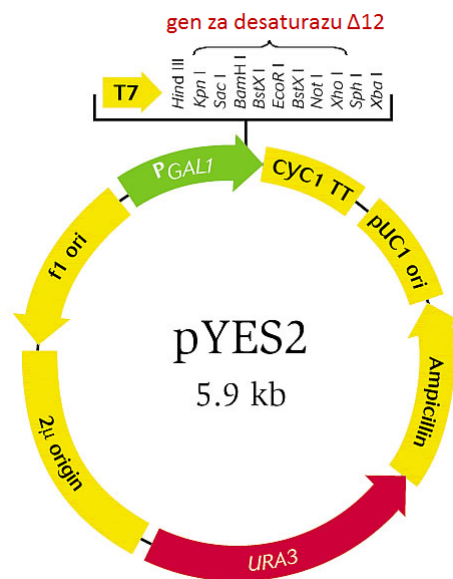
Kako bi se identificirali važni geni, koji su uključeni u odgovor stanice kvasca na prisutnost PUFA, u fiziološkim uvjetima i uvjetima oksidacijskog stresa, napravljena je sveobuhvatna analiza utjecaja PUFA na rast 4300 dostupnih jednostrukih mutanata na mediju s galaktozom i na mediju s galaktozom i *tert*-butil hidroperoksidom. U svrhu ove analize napravljen je soj s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. SOJEVI KVASCA I UVJETI RASTA

2.1.1. Plazmid pYES2

Plazmid pYES2 (Invitrogen) (slika 12), s ugrađenim genom za desaturazu $\Delta 12$ (GenBank, Accession No. DQ023609) iz biljke kaučuka, *Hevea brasiliensis*, (označen kao pYES2desa), ustupljen je ljubaznošću prof. Seppa Kohlweina sa Sveučilišta Karl-Franz u Grazu.



Slika 12. Plazmid pYES2. Modificirano prema Invitrogen, 2008.

Plazmid pYES2 je episomalni ekspresijski vektor veličine 5.9 kb, koji je u stanici kvasca prisutan u velikom broju kopija, a koristi se za inducibilnu ekspresiju rekombinantnih proteina u kvascu. Gen za $\Delta 12$ desaturazu ugrađen je u višestruko mjesto za kloniranje između mjesta koja prepoznaju restrikcijski enzimi KpnI i XhoI, a ispred inducibilnog promotora *GAL1* (dio *GAL1/GAL10* promotorske regije *S. cerevisiae*). Promotor *GAL1* sadrži regiju za regulaciju inicijacije transkripcije, a geni koji se kloniraju u vektor moraju sadržavati inicijacijski kodon za početak translacije. Transkripcija s promotora *GAL1* inhibirana je u prisustvu glukoze, a inducira se dodatkom galaktoze, koja ujedno služi kao izvor ugljikohidrata. Plazmid pYES2 također sadrži signalni slijed *CYC1* iz *S.cerevisiae*, koji osigurava učinkovitu terminaciju transkripcije kloniranog gena te stabilizaciju transkribirane mRNA. U plazmidu pYES2 također se nalazi regija 2μ ori, koja je odgovorna za replikaciju i održavanje visokog broja kopija ovog plazmida u *S. cerevisiae*. Plazmid pYES2 sadrži gen

URA3, koji se koristi kao selekcijski marker u stanicama kvasca, budući omogućava preživljenje sojeva s genotipom *ura3Δ* u mediju bez uracila. Plazmid pYES2 također se može umnožavati u bakteriji *Escherichia coli*, budući sadrži regiju pUC ori za početak replikacije plazmida u *E. coli*, a kao selekcijski marker sadrži gen koji *E. Coli* daje rezistenciju na ampicilin.

2.1.2. Sojevi kvasca

Sojevi kvasca korišteni u ovom radu navedeni su u tablici 4. Svi osnovni sojevi ustupljeni su ljubaznošću prof. Seppa Kohlweina sa Sveučilišta Karl-Franz u Grazu. Soj Y7092desa i dvostruki mutanti iz SGA kolekcije konstruirani su za potrebe izrade ovog rada.

Tablica 4. Popis sojeva kvasca koji su korišteni u ovom radu. XXX::*KanMX4* označava mutirani gen (XXX) zamijenjen sa kazetom *KanMX4*, koja daje rezistenciju na selekcijski marker genicidin (G418). Za metodu SGA, korištena je kompletna kolekcija od 4300 jednostrukih vijabilnih mutanata. Regija *natMX-GAL1-desal-CYC1*, označava DNA fragment koji je ugrađen u lokus *his3Δ1*, a sadrži promotor GAL1, gen *Δ12* desaturazu (*desa1*), terminator transkripcije *CYC1* i selekcijski marker: kazetu *natMX*, koja daje kvascu rezistenciju na antibiotik ClonNAT

Soj	Genotip	Izvor
BY4742	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ1 lys2Δ0ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>cta1</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR256c::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>ctl1</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGR088w::KanMX4</i>	Euroscarf
<i>pox1</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGL205w::KanMX4</i>	Euroscarf
Y7092	MATa <i>can1Δ::STE2pr-his5 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>	Boone Lab
Y7092desa	MATa <i>can1Δ::STE2pr-his5 his3Δ1::natMX-GAL1-desal-CYC1 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0</i>	ovaj rad
SGA kolekcija - jednostruki mutanti	MATa <i>his3Δ1 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 XXX::KanMX4</i>	Euroscarf
SGA kolekcija - „dvostruki“ mutanti	MATa <i>can1Δ::STE2pr-his5 his3Δ1::natMX-GAL1-desal-CYC1 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 XXX::KanMX4</i>	ovaj rad

Sojevi BY4742, *cta1*, *ctl1* i *pox1*, transformirani su s plazmidom pYES2 koji omogućava rast na minimalnoj podlozi bez uracila te pYES2desa u koji je ukloniran gen za

Δ 12 desaturazu. Sukladno tome, sojevi transformirani plazmidom pYES2 označeni su u daljnjem tekstu sufiksom –ctrl, a označava kontrolni soj kvasca, dok su sojevi transformirani plazmidom pYES2desa označeni sufiksom –desa, a označava prisutnost Δ 12 desaturaze. Soj Y7092desa konstruiran je u svrhu izrade metode SGA i ima kromosomski ugrađen fragment za Δ 12 desaturazu. Sukladno tome, svi „dvostruki“ mutanti koji su dobiveni ovom metodom imaju uz delekciju određenog funkcionalnog gena i kromosomski ugrađen gen za Δ 12 desaturazu.

2.1.3. Hranjivi mediji i otopine (sastav izražen po masenim udjelima)

a) Osnovni mediji

1. Sastav kompletne podloge SD (eng. Synthetic Defined): 0,67% kvašćeve dušične baze bez aminokiselina (eng. Yeast Nitrogen Base, Difco, SAD) uz dodatak potrebnih aminokiselina i baza: 0,004% adenina, 0,002% arginina, 0,002% histidina, 0,001% leucina, 0,003% lizina, 0,002% metionina, 0,01% treonina i 0,002% triptofana (sve Sigma, SAD) i 0,004 % uracila. Kao izvor ugljika korištena je glukoza ili galaktoza (Difco, SAD), u konačnoj koncentraciji od 1% ili 2%; medij s glukozom u daljnjem tekstu označen je kao SD/glu, a medij s galaktozom kao SD/gal. Mješavina aminokiselina i uracil pripremljeni su kao matične vodene otopine (50x) i dodavani su u medij nakon autoklaviranja. Sojevi transformirani plazmidom pYES2 ili pYES2desa uzgajani su na podlozi SD bez dodatka uracila (SD-ura), dok su sojevi s kromosomski ugrađenim genom za Δ 12 desaturazu uzgajani u potpunom SD mediju.

2. Medij YEPD: 2% glukoza (Difco, SAD), 2% pepton (Difco, SAD), 1% kvašćev ekstrakt (eng. Yeast Extract, Difco, SAD).

3. Medij LB (Luria-Bertani): 1% Bacto tripton (Difco, SAD), 0,5% kvašćev ekstrakt, 1% NaCl (Kemika, Hrvatska). Medij je korišten za uzgoj bakterije *E. coli* transformirane plazmidima pYES2, pYES2desa, pYES2desa-natMX i p4339 u svrhu umnažanja i izolacije plazmida. Kao selekcijski marker za stanice s plazmidima pYES2 i p4339 korišten je antibiotik ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 μ g/ml, a za pripremu kompetentnih stanica korišten je antibiotik tetraciklin u konačnoj koncentraciji 12,5 μ g/ml.

Krute podloge nadopunjene su agarom (2%) (Difco, SAD).

b) Medij suplementiran oleinskom kiselinom

Svi sastojci za jednu litru kompletnog SD medija otopljeni su u 860 ml destilirane vode i autoklavirani (aminokiseline i uracil dodani su nakon autoklavliranja). Posebno je napravljena 0,1%-tna matična otopina oleinske kiseline (Sigma) u vodenoj otopini 10%-tnog Tergitola (Sigma); otopina je zagrijavana u vodenoj kupelji (60°C) dok se oleinska kiselina nije otopila. Nakon autoklavliranja, SD medij je ohlađen na 60°C i nadopunjen s 100 ml matiče otopine oleinske kiseline u konačnoj koncentraciji: oleinska kiselina (0,01%) i Tergitol (1%).

c) Selektivni mediji korišteni u metodi „Synthetic genetic array“ (SGA):

1. YEPD+G418/clonNAT: nakon autoklavliranja, u ohlađeni YEPD medij (~65°C) dodano je 1 ml antibiotika G418 (konačna koncentracija 200 mg/l) i 1 ml antibiotika clonNAT (konačna koncentracija 100 mg/l).

2. Medij za sporulaciju: 1% kalijevog acetata (Fisher), 0,1% kvašćevog ekstrakta, 0,05% glukoze, 0,01% mješavine praha aminokiselina za sporulaciju. G418 dodan je u konačnoj koncentraciji 50 mg/l.

3. SD-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin: 0,67% kvašćeve dušične baze bez aminokiselina, 0,2% mješavine praha aminokiselina (-His/Arg/Lys), 2% glukoze. Tializin i kanavanin dodani su u konačnim koncentracijama 0,025 mg/l, svaki.

4. SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418: 0,17% kvašćeve dušične baze bez aminokiselina, 0,1% MSG (engl. L-glutamic acid sodium salt hydrate), 0,2% mješavine praha aminokiselina (-His/Arg/Lys), 2% glukoze. Tializin i kanavanin dodani su u konačnim koncentracijama 0,025 mg/l svaki, te G418 u konačnoj koncentraciji 200 mg/l.

5. SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT: sastav je bio identičan kao i u mediju pod rednim brojem 4., uz to što je dodan i clonNAT u konačnoj koncentraciji 100 mg/l.

6. SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT: sastav je bio identičan kao i u mediju pod rednim brojem 5., s time da je umjesto glukoze dodana galaktoza (2%).

7. SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT + tBH: sastav je bio identičan kao i u podlogama pod rednim brojevima 5. i 6., uz to što je dodatan *tert*-Butil hidroperoksid (tBH, Sigma) u konačnoj koncentraciji 0,9 mM.

Sastav mješavine praha aminokiselina i hranjivih suplemenata korištenih u medijima od rednog broja 3. do 7.: 3 g adenina, 2 g uracila (ICN), 2 g inozitola, 0,2 g para-aminobenzoične kiseline (Acros Organics), 2 g alanina, 2 g aspargina, 2 g aspartinske kiseline, 2 g cisteina, 2 g glutamatske kiseline, 2 g glutamina, 2 g glicina, 2 g izoleucina, 10 g leucina, 2 g metionina, 2 g fenilalanina, 2 g prolina, 2 g serina, 2 g treonina, 2 g triptofana, 2 g tirozina, 2 g valina (Fisher). Svi proizvodi, osim označenih, su od proizvođača Sigma, SAD. Ovoj mješavini nedostaju aminokiseline lizin, histidin i arginin, što je korišteno kao selekcijski marker.

Sastav mješavine praha aminokiselina i hranjivih suplemenata za sporulaciju (medij pod rednim brojem 2.): 2 g histidina, 10 g leucina, 2 g lizina, 2 g uracila.

Svi antibiotici koji su korišteni u selekcijskim podlogama dodavani su u podloge nakon autoklaviranja, kada je temperatura medija bila oko 65°C, a prethodno su napravljeni kao matične vodene otopine: G418 (Geneticin, Invitrogen) 200 mg/ml; clonNAT (engl. Nourseothricin, Werner BioAgents, Jena, Njemačka) 100 mg/ml; kanavanin (engl. L-canavanine sulfate salt, Sigma) 100 mg/ml; tializin (engl. S-(2-aminoethyl)-L-cystein hydrochloride, Sigma) 100 mg/ml. Sve matične otopine sterilizirane su filtriranjem (0,2 μm) i čuvane na +4°C.

Tert-butil hidroperoksid napravljen je kao matična otopina u destiliranoj vodi u koncentraciji 365 mM neposredno prije dodavanja u medije pod rednim brojem 7.

2.1.4. Uvjeti i praćenje rasta stanica

Sojevi kvasca uzgajani su na krutoj hranjivoj podlozi na 30°C ili u tekućem hranjivom mediju također na 30°C, ali uz stalnu kružnu trešnju brzine 250 okretaja/minuti. Stanice *E. coli* uzgajane su na isti način, ali na 37°C. Za svaki pokus, sojevi su svježe nasadeni na agarozne ploče iz zamrznutih glicerolskih kultura (-80°), te su stanice uzgajane 2 dana do pojave pojedinačnih kolonija koje su korištene u daljnjem radu.

Kako bi se pratio rast kultura kvasca uzgajanih u tekućoj hranjivoj podlozi, mjerena je optička gustoća kultura odgovarajućeg razrjeđenja, pri valnoj duljini od 600 nm (OD₆₀₀)

(UV1601, Shimadzu, Japan). Za pozadinsko mjerenje korišteno je razrjeđenje medija u kojem su stanice uzgajane, ekvivalentno razrjeđenju stanica.

2.2. TRANSFORMACIJA I IZOLACIJA PLAZMIDA

2.2.1 Transformacija kvasca

Transformacija stanica kvasca rađena je metodom litijeva acetata [165]. Stanice kvasca uzgajane su preko noći u tekućem mediju YEPD na 30°C. Drugi dan izmjerena je optička gustoća kulture, koja je zatim razrijeđena u 20 ml tekućeg medija YEPD na OD₆₀₀ 0,4 te inkubirana na 30°C 4 sata do OD₆₀₀ ~ 1,5. Po završetku inkubacije, stanice su isprane u dva uzastopna koraka, s 25 ml i 1 ml destilirane vode; u svakom koraku stanice su centrifugirane na 2500 g 5 minuta, a supernatant bačen. Nakon zadnjeg ispiranja, talog stanica resuspendiran je u 650 µl destilirane vode (OD₆₀₀ ~ 50). Za transformaciju, 100 µl suspenzije stanica je alikvotirano u nove mikroeprevete, te je redom dodavano: 240 µl PEG 3400 (50%, v:v, Sigma), 36 µl 1 M litijevog acetata, 10 µl ssDNA (10 mg/ml, Invitrogen) i 5 µl plazmida (~1µg pYES2 ili pYES2desa). Smjesa je dobro promiješana i inkubirana na 30°C 30 minuta. Po isteku inkubacije transformacijskoj smjesi dodano je 40 µl dimetil sulfoksida (DMSO, Sigma) te je smjesa inkubirana na 42°C 10 minuta kako bi se izazvao toplinski šok. Nakon toga, stanice su centrifugirane na 6000 g 1 minutu, a talog je resuspendiran u 100 µl destilirane vode. Kompletan volumen nasaden je na SD-ura selektivne ploče s glukozom, koje omogućavaju rast transformantima s pYES2 plazmidima.

Prilikom transformacije soja Y7092 linearnim fragmentom DNA (*natMX-GALI-desal-CYCI*), korišteno je 8 µg pročišćenog PCR produkta, kako bi se povećala učinkovitost transformacije. Također, nakon koraka toplinskog šoka, stanice su centrifugirane i prebačene u tekući medij YEPD na 3 sata (30°C), kako bi se omogućila kromosomska ugradnja DNA fragmenta (rekombinacijskim popravkom) i ekspresija kazete *natMX* (koja daje rezistenciju na clonNAT). Nakon toga stanice su prebačene na selektivni medij s antibiotikom clonNAT.

2.2.2. Izolacija plazmida iz *E. coli*

Pojedinačne kolonije bakterije *E. Coli*, transformirane plazmidima pYES2, pYES2desa, pYES2desa-natMX i p4339, uzgojene na agaroznim pločama, inokulirane su u

tekući LB medij preko noći. Rast prekonoćnih kultura zaustavljen je u eksponencijalnoj fazi rasta ($OD_{600} \sim 4$) na način da su stanice stavljene na led. Plazmidi su izolirani pomoću kompleta GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas, EU). Oko 5 ml stanične kulture centrifugirano je na 10000 g 2 minute. Supernatant je bačen, a talog stanica otopljen je na električnoj miješalici u 250 μ l pufera za resuspenziju. Otopina stanica prebačena je u mikroeprovete od 1,5 ml (Eppendorf) te je dodano 250 μ l pufera za lizu stanica. Nakon laganog okretanja epruvete i inkubacije od 3 minute na sobnoj temperaturi dodano je 10 μ l otopine alkalne fosfataze. Epruvete su ponovno lagano okretane nekoliko puta, nakon čega je slijedila inkubacija od 3 minute. Dodano je 350 μ l otopine za neutralizaciju i epruvete su ponovno lagano okretane nekoliko puta. Lizati stanica su centrifugirani na 14000 g 10 minuta kako bi se uklonili razgrađeni dijelovi stanica i kromosomska DNA. Supernatant je prebačen u GENJet[®] kolone koje su centrifugirane na 12000 g 1 minutu. Kolone su zatim isprane dva puta s 500 μ l otopine za ispiranje u koju je prethodno dodan etanol. Nakon drugog ispiranja, kolone su naknadno centrifugirane radi uklanjanja ostataka otopine za ispiranje. Zatim, kolona je prebačena u novu epruvetu, a plazmid je eluiran prvotnom inkubacijom s 50 μ l otopine za eluiranje (2 minute), te naknadnim centrifugiranjem na 14000 g 2 minute. Ovako dobiveni plazmid pohranjen je na -20°C do upotrebe.

2.2.3. Priprema kompetentnih stanica *E. Coli*

Soj *E. Coli*, XL-1 (ustupljen ljubaznošću dr.sc. Helene Četković iz Laboratorija za Molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković) uzgojen je na agaroznim pločama s tetraciklinom (12,5 $\mu\text{g/ml}$). Stanice su inokulirane u tekući LB medij iz pojedinačne kolonije. Idući dan prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta u 350 ml svježeg LB medija (v:v). Stanice su uzgajane do optičke gustoće OD_{600} 0,45, nakon čega je kultura prebačena na led i svi daljnji koraci rađeni su na temperaturi nižoj od 4°C . Ohlađena stanična kultura centrifugirana je 12 minuta na 4000 g, supernatant je bačen, a stanice su resuspendirane u 300 ml destilirane vode. Slijedila su dodatna dva koraka ispiranja s 100 ml destilirane vode, nakon svakog koraka stanice su centrifugirane, a supernatant bačen. Nakon zadnjeg centrifugiranja, talog stanica resuspendiran je u 15 ml 10%-tne vodene otopine glicerola. Stanice su ponovno centrifugirane kao u svakom koraku, a talog stanica resuspendiran je u 750 μ l 10%-tne otopine glicerola. Alikvoti od 40 μ l smjese stanica otpipetirani su u mikroeprovete, nakon

čega su kompetentne stanice naglo zamrznute u tekućem dušiku i dalje čuvane na -80°C do korištenja.

2.2.4. Transformacija kompetentnih stanica

Kompetentne stanice *E. Coli* (XL-1) transformirane su plazmidom pYES2desa-natMX metodom elektroporacije. Ova metoda zasniva se na povećanoj propusnosti stanične membrane prema molekuli DNA (plazmid, PCR fragment), izazvanoj primjenom vanjskog električnog polja na stanicu. Alikvot od 40 µl kompetentnih stanica otopljen je na ledu te su stanice dobro pomiješane s 1,5 µl ligacijske smjese (pYES2desa-natMX) i prebačene na dno plastične kivete s aluminijskim elektrodama za elektroporaciju. Kiveta je prebačena u ohlađeni nosač za kivete koji je zatim umetnut u elektroporator (Electroporator 2510, Eppendorf). Stanice su bile izložene električnom polju jačine 2500 V u trajanju od 5 milisekundi. Nakon toga stanice su brzo prebačene u 1 ml ugrijanog LB medija te su ostavljene 1 sat u inkubatoru na 37°C, kako bi se omogućila ekspresija gena za rezistenciju na ampicilin. Nakon toga kompletan volumen stanica presađen je na LB ploče s ampicilinom, u svrhu selekcije transformanata s plazmidom pYES2desa-natMX.

2.3. ISPITIVANJE UTJECAJA PUFA NA MUTANTE UKLJUČENE U PROCES β-OKSIDACIJE

Za ove pokuse korišteni su jednostruki mutanti bez dva važna gena u procesu β-oksidacije: mutant kojem nedostaje acil-CoA oksidaza (*pox1*) i mutant bez peroksisomalne katalaze A (*cta1*). Također, kao kontrola, korišten je mutant bez citoplazmatske katalaze T (*ctt1*) te divlji tip kvasca (BY4742). Svi sojevi transformirani su plazmidom pYES2desa, a kao kontrola korišteni su isti sojevi transformirani praznim plazmidom pYES2. U svim pokusima korišteni su hranjivi mediji s glukozom ili galaktozom u koncentraciji 1% (w:v).

2.3.1. Utjecaj PUFA na fiziologiju rasta

Pojedinačne kolonije navedenih mutanata inokulirane su u 5 ml tekućeg medija SD-ura/glu i ostavljene preko noći u rotacionom inkubatoru. Idući dan stanice su isprane destiliranom vodom i nasađene kao početne kulture gustoće OD₆₀₀ 0,1 u mediju SD-ura/gal,

kako bi se inducirala ekspresija gena $\Delta 12$ desaturaze. Rast stanica praćen je tijekom 40 sati od trenutka nasađivanja stanica u mediju s galaktozom.

2.3.2. Određivanje osjetljivosti na oksidacijski stres

Stanice iz eksponencijalne faze rasta ($OD_{600} \sim 1,5$), uzgajane u tekućem mediju s galaktozom (SD-ura/gal) razrijeđene su na gustoću OD_{600} 0,5 u istom mediju, te je dodan vodikov peroksid u konačnoj koncentraciji 1,5 mM. Paralelno, inokulirane su stanice bez tretmana vodikovim peroksidom, kao kontrola. Stanice su inkubirane tijekom 6 sati, a rast stanica praćen je svaka 2 sata mjerenjem optičke gustoće (OD_{600}). Rezultati su prikazani kao postotak rasta tretiranih stanica u odnosu na netretirane kontrole (mjereno nakon 4 sata dok su sve stanice bile u logaritamskoj fazi rasta).

2.3.3. Određivanje unutarstaničnog ROS-a

Metoda se temelji na deacilaciji i unutarstaničnoj oksidaciji 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA, Fluka, Njemačka) u fluorescentni 2,7-diklorofluorescein (DCH) [166]. Spoj DCFH-DA ne fluorescira dok se ne pocijepa unutarstaničnim esterazama, te kao takav postaje visoko reaktivan s vodikovim peroksidom pri čemu dolazi do oksidacije i fluorescencije, stoga se standardno koristi za unutarstanično određivanje ROS-a. Stanice iz eksponencijalne faze rasta ($OD_{600} \sim 1,5$), uzgajane u mediju SD-ura/gal su centrifugirane, a talog stanica otopljen je u 1 ml fosfatnog pufera (PBS, pH 7,0) s DCFH-DA u konačnoj koncentraciji 100 μ M i konačnoj gustoći stanica OD_{600} 2,0. Stanice su inkubirane 1 sat u rotacionom inkubatoru na 30°C, kako bi se omogućio ulazak boje u stanicu. Nakon toga stanice su isprane jedan puta u PBS-u i nasađene u volumenu od 100 μ l (OD_{600} 2,0) u kvadriplikatima u mikrotitarske pločice za mjerenje fluorescencije (Thermo Scientific). Za mjerenje ROS-a nakon tretmana vodikovim peroksidom, stanice su nasađene u volumenu 200 μ l (OD_{600} 1) s vodikovim peroksidom u konačnoj koncentraciji 4 mM. Nakon 2 sata inkubacije, uz konstantno miješanje, intenzitet fluorescencije (RFU) izmjeren je pomoću fluorescentnog spektrofotometra (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian). Valna duljina ekscitacijskog zračenja bila je 500 nm, a emisijsko zračenje mjereno je na 530 nm. Rezultati su prikazani kao postotak intenziteta fluorescencije stanica koje proizvode PUFA, u odnosu na njihove kontrole s praznim plazmidom pYES2.

2.3.4. Priprema uzoraka za kolorimetrijske metode

Za mjerenje glutationa, aktivnosti katalaze i glutation-S-transferaze stanice uzgajane u mediju SD-ura/gal sakupljene su u eksponencijalnoj fazi rasta ($OD_{600} \sim 1,5$). Zatim, stanice su centrifugirane na 3000 g 5 minuta, isprane desiliranom vodom, a suhi talog stanica zamrznuti su na -80°C do analize. Stanice su homogenizirane mehaničkim razaranjem staklenim kuglicama (425-600 μm , Sigma) pomoću automatskog razarača stanica (Disruptor genie, Scientific Industries, USA). Homogeniziranje stanica rađeno je u sedam intervala od po jednu minutu, uz hlađenje na ledu (1 minuta) nakon završenog svakog intervala. Ovisno o metodi, stanice su homogenizirane u posebnim puferima; za mjerenje katalazne aktivnosti (60 mM KH_2PO_4 , pH 7.4); za mjerenje glutationa (10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM EDTA, pH 7.4); za mjerenje glutation-S-transferazne aktivnosti (100 mM KH_2PO_4 , 0.1% n-dodecil β -D-maltozid (DDM, Sigma) pH 6.25). Stanični homogenati zatim su centrifugirani na 16000 g 15 minuta pri 4°C , a bistri supernatanti prebačeni su u nove mikroeprovete i zamrznuti na -80°C do analize.

2.3.5. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina korištena je kolorimetrijska metoda po Bradfordu [167]. Na 10 μl supernatanta staničnih homogenata i standarda, u mikrotitarskoj pločici, dodano je 200 μl Bradfordovog reagensa (100 mg *Coomassie Brilliant Blue*[®] G-250, 50 mL 96% EtOH, 100 ml 85% fosfatne kiseline – za 1L otopine). Kao standardi, korištena su različita razrijeđenja albumina iz goveđeg seruma (BSA, Sigma) u rasponu koncentracija 0,0375 - 1 mg/ml. Intenzitet plavog obojenja, koji nastaje u reakciji proteina i Bradfordovog reagensa mjereno je apsorpcijom valne duljine od 595 nm.

2.3.6. Određivanje koncentracije unutarstaničnog glutationa

Za određivanje koncentracije unutarstaničnog glutationa, korišten je prilagođeni protokol od Tietzea [168]. Supernatanti staničnih homogenata razrijeđen je 1:50 (v:v) u vodenoj otopini klorovodične kiseline (10 mM). Uzorci (150 μl) otpipetirani su u triplikatima u mikrotitarske pločice. Kao standardi, korištena su serijska razrijeđenja reduciranog

glutaciona (0 - 5 μ M). Reakcija je započeta dodatkom 75 μ l otopine sastava: 5,5'-ditio -bis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, 1.8 mM), GSH reduktaze (0.03 mg/ml) i NADPH (0.6 mM) u fosfatnom puferu (100 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA pH 7.4). Sve otopine su pripremljene svježe na ledu i pomiješane neposredno prije izvođenja eksperimenta. Princip metode bazira se na spektrofotometrijskom mjerenju kinetike formiranja 2-nitro-5-tiobenzoične kiseline (žuto obojenje), koja nastaje u reakciji reduciranog glutaciona i DTNB. GSH reduktaza uz pomoć NADPH reducira oksidirani glutation (GSSG) u GSH, koji zatim reducira DTNB. Reakcija je inkubirana na ledu, a kinetika reakcije mjerena je svakih 60 sekundi pri valnoj duljini 415 nm na mikrotitarskom čitaču pločica (Anthos, Njemačka). Količina unutarstaničnog glutaciona izražena je prema količini proteina u staničnom homogenatu (nmol/mg). Rezultati su prikazani kao postotak koncentracije unutarstaničnog glutaciona u stanicama koje proizvode PUFA u odnosu na njihovu kontrolu s praznim plazmidom pYES.

2.3.7. Određivanje aktivnosti katalaze

Katalaza spada u grupu antioksidacijskih enzima čija je funkcija neutralizacija vodikovog peroksida koji se raspada do molekula vode i kisika. Obje kvaščeve katalaze reduciraju vodikov peroksid koristeći redoks svojstva hem grupe kompleksirane u proteinu. Ovom metodom mjeri se ukupna aktivnost obiju katalaza, osim u slučaju mutanata deficijernih u jednoj od katalaza (A ili T).

Supernatanti staničnih homogenata (25 μ l) pomiješani su s 50 μ l fosfatnog pufera (120 mM KH₂PO₄, pH 7,4) u mikrotitarskim pločicama, u triplicatima. Reakcija je započeta dodatkom 50 μ l vodene otopine vodikovog peroksida koncentracije 250 mM. Kao standardi korištena su serijska razrjeđenja vodikovog peroksida (0 – 100 mM). Reakcija je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se omogućila reakcija katalaze i vodikovog peroksida. Reakcija je zaustavljena dodatkom 100 μ l otopine amonijevog molibdata koncentracije 200 mM, koji stvara žuto obojenje u reakciji s vodikovim peroksidom. Intenzitet boje mjereno je na čitaču pločica pri 450 nm (Anthos, Njemačka).

Za očitavanje vrlo niske aktivnosti peroksisomalne katalaze A, u mutantima bez citoplazmatske katalaze T (*ctt1*) protokol je prilagođen kako slijedi: 50 μ l supernatanta staničnih homogenata pomiješano je s 25 μ l fosfatnog pufera, a reakcija je započeta dodatkom 50 μ l vodikovog peroksida koncentracije 100 mM. Kao standardi, korištena su serijska razrjeđenja vodikovog peroksida (0 – 40 mM). Jedinica aktivnosti katalaze (1 U) definira se

kao količina enzima koja je potrebna da razgradi μmol vodikovog peroksida u 1 minuti pri 25°C . Aktivnost katalaze izražena je prema količini proteina staničnom homogenatu (U/mg). Rezultati su prikazani kao postotak aktivnosti katalaze u stanicama koje proizvode PUFA, u odnosu na njihove kontrole s praznim plazmidom pYES2.

2.3.8. Određivanje aktivnosti glutathion-S-transferaza

Ovom metodom mjerena je ukupna glutathion-S-transferazna aktivnost u stanicama kvasca, prema prilagođenom protokolu po Habigu [169]. Supernatanti staničnih homogenata ($200\ \mu\text{l}$) pomiješani su u kiveti s $800\ \mu\text{l}$ kalij-fosfatnog pufera ($100\ \text{mM}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,0) koji je sadržavao $0.3\ \text{mM}$ 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) i $1\ \text{mM}$ reduciranog GSH. Reakcija je inkubirana na sobnoj temperaturi. Princip metode temelji se na međusobnoj reakciji supstrata GSH i CDNB koju kataliziraju enzimi s glutathion-S-transferaznim djelovanjem, pri čemu nastaje obojeni adukt GS-DNB. Kinetika reakcije mjerena je svakih 60 sekundi na UV/Vis spektrofotometru (UV1601, Shimadzu, Japan), apsorpcijom valne duljine od $340\ \text{nm}$. Jedinica aktivnosti glutathion-S-transferaza (1 U) definirana je kao količina enzima potrebna za proizvodnju $1\ \mu\text{mol}$ GS-DNB pri 25°C . Aktivnost enzima izražena je prema količini proteina u staničnom lizatu (U/mg), a rezultati su prikazani kao postotak aktivnosti glutathion-S-transferaza u sojevima koji proizvode PUFA u odnosu na njihove kontrole s praznim plazmidom pYES2.

2.4. KROMOSOMSKA UGRADNJA GENA ZA $\Delta 12$ DESATURAZU

Za primjenu SGA metode bilo je potrebno konstruirati soj kvasca koji uz kromosomski ugrađen gen za $\Delta 12$ desaturazu ima selekcijski marker, kasetu natMX, koja stanici kvasca daje rezistenciju na antibiotik clonNAT. Popis DNA početnica koje su korištene prilikom izrade ovog soja prikazane su u tablici 5. Soj bakterije *E. Coli* transformiran plazmidom p4339 (Boone Lab) koji sadrži kasetu natMX ustupljen je ljubaznošću prof. Seppa Kohlweina. Plazmid je izoliran prema standardnom protokolu ranije opisanome u poglavlju 2.2.2. Metodom PCR amplificiran je DNA fragment kazete natMX s plazmida p4339; korištene su DNA početnice s fosforiliranim krajevima u svrhu kasnijeg lakšeg izvođenja tupe ligacije ovog fragmenta i lineariziranog vektora pYES2desa. Veličina očekivanog PCR produkta ($1150\ \text{pb}$) potvrđena je DNA elektroforezom na agaroznom gelu

(opisano u poglavlju 2.4.5), a PCR produkt pročišćen je pomoću kompleta PCRquick-spin™ (iNtRON Biotechnology).

Tablica 5. DNA početnice (Invitrogen) korištene tijekom konstrukcije soja Y7092desa s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu i kazetom *natMX* unutar lokusa *his3 $\Delta 1$* na kromosomu XV.

DNA početnica	Sekvenca
Nat-f	5'P- ACATGGAGGCCAGAAATACCCT-3'
Nat-r	5'P-CAGTATAGCGACCAGCATTAC-3'
HIS3-NAT-f	5'-ATGAAACCAAGATTCAGATTGCGATCTCTTTAAAGGGTGGT CCCCTAGCACATGGAGGCCAGAAATACCCT-3'
HIS3-DESA-r	5'-CATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTCTTATGGCA ACCGCAAGGGCCGCAAATTAAGCCTTC-3'
Desa(ugr)-F	5'-GTGTGTTTACGTCGAGCCAGATG-3'
Down His3-R	5'-GCCTCGTTCAGAATGACACGTA-3'

Zatim, plazmid pYES2desa podvrgnut je razgradnji (linearizaciji) restrikcijskim enzimom koji stvara tupe krajeve (opisano u poglavlju 2.4.4). Uspješnost razgradnje potvrđena je na agaroznom gelu. Budući restrikcijska razgradnja nije bila potpuna, linearizirani plazmid skalpelom je izrezan iz gela i pročišćen pomoću kompleta MEGAquick-spin™ (JH Science). Pročišćeni linearni plazmid pYES2desa zatim je podvrgnut reakciji alkalnom fosfatazom, kako bi se defosforilirali tupi krajevi, odnosno, kako bi se spriječila mogućnost autoligacije linearnog plazmida (opisano u poglavlju 2.4.2.). Defosforilirani plazmid ponovno je pročišćen iz agaroznog gela pomoću kompleta MEGAquick-spin™, nakon čega je napravljena tupa ligacija lineariziranog i defosforiliranog vektora pYES2desa i kazete *natMX* (opisano u poglavlju 2.4.2.). Ligacijska smjesa korištena je za transformaciju bakterije *E. Coli*. Bakterijske kolonije, koje su narasle na selektivnim podlogama s ampicilinom, korištene su u metodi PCR na kolonijama (opisano u poglavlju 2.4.3.), kako bi se potvrdila ugradnja kazete *natMX* u plazmid pYES2desa. U PCR reakciji korištene su fosforilirane DNA početnice za umnažanje kazete *natMX*, a ugradnja kazete *natMX* potvrđena je usporedbom veličine umnoženog PCR fragmenta (1150 pb) sa standardnom DNA ljestvicom na agaroznom gelu. Novi plazmid, pYES2desa-*natMX*, izoliran je iz *E.coli*, kako bi se pomoću razgradnje plazmida restrikcijskim enzimima potvrdila orijentacija ugrađene kazete *natMX* (opisano u poglavlju 2.4.4.); razgradnjom je dobiven DNA fragment

veličine 1113 pb (provjera na agaroznom gelu) čime je potvrđena orijentacija kazete *natMX* u smjeru 5'→3' (promotor→terminator transkripcije) uzvodno od regije *GALI-desal-CYCI*.

U sljedećem koraku bilo je potrebno umnožiti linearni fragment DNA *natMX-GALI-desal-CYCI* za kromosomsku ugradnju u kvascu. Umnažanje ovog fragmenta s plazmida pYES2desa-*natMX* napravljeno je metodom PCR uz pomoć para DNA početnica koje imaju viseće krajeve, čiji je slijed baza komplementaran regijama unutar kvašćevog lokusa *his3Δ1* na kromosomu XV. Na taj način su na krajeve umnoženog PCR fragmenta, *natMX-GALI-desal-CYCI*, uvedene regije koje omogućavaju njegovu kromosomsku ugradnju, pri čemu pomaže i vrlo učinkovit mehanizam rekombinacijskog popravka DNA kod kvasca [170]. PCR umnažanjem dobiven je očekivani linearni DNA fragment veličine 3304 pb (provjera na agaroznom gelu), koji je zatim pročišćen pomoću kompleta PCRquick-spinTM, određena mu je koncentracija, te je iskorišten za transformaciju soja Y7092. Kolonije koje su narasle na selektivnim podlogama s antibiotikom clonNAT korištene su za provjeru ugradnje ovog fragmenta, metodom PCR na kolonijama. Korišten je par početnica koji prepoznaje regiju 206 pb nizvodno od mjesta ugradnje fragmenta DNA *natMX-GALI-desal-CYCI* i regiju unutar ugrađenog fragmenta. Umnoženi fragment bio je veličine oko 550 parova baza (provjera na agaroznom gelu), čime je potvrđena kromosomska ugradnja ovog fragmenta u lokusu *his3Δ1*. Funkcionalna ekspresija desaturaze Δ12 u dobivenom soju, nazvanom Y7092desa, potvrđena je analizom sastava masnih kiselina.

2.4.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za izvođenje PCR reakcija korišten je komplet PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Takara) i aparat Mastercycler gradient (Eppendorf). Prije svake reakcije napravljen je „Master mix“ sljedećeg sastava: pufer za polimerazu PrimeSTAR (koncentracija Mg²⁺ 1mM), mješavina deoksinukleozid trifosfata (dNTPs, koncentracija 800 μM; 200 μM svaki), DNA početnice (0,6μM; 0,3 μM svaka) i mqH₂O. Posebno u mikroeprovete za PCR (200 μl) dodano je 1 μl kalupa DNA (~25 ng plazmidne DNA). Neposredno prije početka reakcije u „Master mix“ dodana je polimeraza (PrimeSTAR[®] HS DNA) u konačnoj koncentraciji 0,025 U/μl, a zatim je „Master mix“ otpipetiran u mikroeprovete s DNA kalupom, u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 25 ili 50 μl. Program PCR reakcije odvijao se u 30 ponavljajućih ciklusa: 10 sekundi denaturacija na 98°C, 5 sekundi sjedanje početnica (engl. annealing) na 55°C, 60 sekundi elongacija na 72°C. Ovom programu prethodio je korak

početne denaturacija 2 minute na 98°C, a nakon posljednjeg ciklusa slijedila je završna elongacija 7 minuta na 72°C, te hlađenje uzoraka na +4°C. Prilikom PCR umnažanja fragmenta *natMX-GAL1-desal-CYC1*, zbog veće dužine početnica, vrijeme sjedanja početnica produženo je na 15 sekundi, a korak elongacije produžen je na 3 minute, zbog veličine umnažanog fragmenta.

2.4.2 Defosforilacija i ligacija

Defosforilacija lineariziranog i pročišćenog plazmida pYES2desa rađena je pomoću alkalne fosfataze (Alkaline phosphatase, shrimp, Roche). U reakcijsku smjesu dodano je 27 µl plazmida (~2 µg), 3,2 µl pufera za alkalnu fosfatazu (10x koncentracija) i 2 µl alkalne fosfataze (2U). Reakcija smjesa inkubirana je 60 minuta na 37°C, nakon čega je enzim termički inaktiviran inkubacijom na 65°C 15 minuta. Defosforilirani plazmid pročišćen je iz agaroznog gela pomoću kompleta MEGAquick-spinTM (JH Science) i eluiran u mqH₂O.

Za ligaciju DNA kazete *natMX* i plazmida pYES2desa korišten je komplet za DNA ligaciju (DNA ligation kit, Takara). U ligacijsku smjesu dodano je 4,4 µl (150 ng) lineariziranog i defosforiliranog vektora pYES2desa, 2,4 µl (240 ng) pročišćene DNA kazete *natMX* (insert), 9,35 µl ligacijske smjese i 2,5 µl vodene otopine PEG4000 (30%, w:v, Sigma). Polimer PEG4000 korišten je kao stabilizator DNA fragmenata čija prisutnost pospješuje učinkovitost ligacije tupih krajeva. Prije reakcije izmjerena je koncentracija vektora i inserta pomoću UV/Vis spektrofotometra za mjerenje malih volumena (BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu), kako bi se lakše optimizirala reakcija ligacije, koja ovisi o pravilnom omjeru broja molekula inserta i vektora. U ovom slučaju optimalan broj molekula inserta prema broju molekula vektora bio je 10:1. Ukupni volumen ligacijske smjese bio je 19 µl, a reakcijska smjesa inkubirana je preko noći na 15°C, te zamrznuta (-20°C) do transformacije *E.coli*.

2.4.3. PCR na kolonijama

PCR na kolonijama (engl. colony PCR) rađen je kako bi se preskočio korak izolacije plazmida ili genomske DNA, koja služi kao kalup za potvrdu ugradnje određenog DNA fragmenta. U ovoj metodi, ukupni stanični lizat (uključujući i DNA) koristi se kao kalup za reakciju PCR. Pojedinačne kolonije s agaroznih selekcijskih ploča (*E. coli* ili kvasac)

resuspendirane su u 1 ml reH₂O u mikroepreveti. Izmjeren je OD₆₀₀ i talog stanica ekvivalentan OD₆₀₀ 0,3 (~3×10⁶ stanica) resuspendiran je u 30 µl vodene otopine SDS 0,25% (w:v). Suspenzija stanica dobro je promiješana i inkubirana 12 minuta na 99°C, kako bi došlo do razgradnje stanica. Tijekom inkubacije suspenzija je dobro promiješana svakih 3 minute na električnoj mješalici 30 sekundi. Homogenati stanica centrifugirani su na 4000 ×g 40 sekundi, kako bi se istaložile nerazgrađene stanice i razgrađeni djelovi stanica. Supernatant, u kojem se nalazila DNA, prebačen je u novu mikroeprevetu te je 1 µl ovako dobivene suspenzije korišteno kao kalup za reakciju PCR.

2.4.4. Razgradnja restrikcijskim enzimima

Plazmid pYES2desa podvrgnut je razgradnji restrikcijskim enzimom NaeI (New England Biolabs) kako bi došlo do linearizacije plazmida. NaeI stvara tupe krajeve, a prepoznaje regiju plazmida pYES2desa, 145 pb uzvodno od promotora GAL1 (unutar lokusa fl ori). Za reakciju, dodano je 5µl pufera za NaeI (NEB4, 10x koncentracija), 5 µl plazmida pYES2desa (~1,5 µg), 3 µl enzima NaeI (30 U) i 37 µl reH₂O. Reakcijska smjesa dobro je promiješana i inkubirana 6 sati na 37°C. Nakon toga je slijedila provjera razgradnje na agaroznom gelu.

Za provjeru smjera ugradnje DNA kazete natMX, u plazmidu pYES2desa-natMX, korišteni su restrikcijski enzimi HindIII i NgoMIV (New England Biolabs). Enzim HindIII prepoznaje regiju unutar mjesta za višestruko kloniranje na plazmidu pYES2desa, a NgoMIV prepoznaje regiju unutar kazete natMX. U reakcijsku smjesu dodano je 4 µl plazmida (~500 ng), 1,25 µl pufera za HindIII (NEB2, 10x koncentracija), 1,25 µl pufera za NgoMIV (NEB4, 10x koncentracija), 1 µl enzima HindIII (20 U), 1,25 µl enzima NgoMIV (12,5 U) i 16,25 µl reH₂O. Reakcijska smjesa inkubirana je 4 sata na 37°C. Nakon toga, slijedila je provjera razgradnje na agaroznom gelu.

2.4.5. DNA elektroforeza na agaroznim gelovima

Za provjeru veličine i pročišćavanje DNA fragmenata (PCR produkti i produkti razgradnje plazmida restrikcijskim enzimima), korištena je DNA elektroforeza na agaroznim gelovima. U radu su korišteni 1%-tni agarozni gelovi (w:v) u puferu TAE (40 mM Tris baza, 20 mM octena kiselina i 1 mM EDTA). Korištena je aparatura za horizontalnu elektroforezu

(Clever Scientific), a prije nanošenja na gel pomiješano je 2 μ l PCR produkta ili razgrađenog/pročišćenog plazmida s 8 μ l dH₂O i 2 μ l 6x koncentriranog pufera za nanošenje uzoraka (vodena otopina brom fenolnog plavila 0,25%, w:v i glicerola 30%, w:v). Kao standardi, pomoću kojih je određena veličina ispitivanih DNA fragmenata korištena je DNA ljestvica od 100 do 10000 pb (Generuler™ DNA Ladder Mix,) i DNA ljestvica od 50 do 1000 pb (Generuler™ 50 pb DNA Ladder), oba od Thermo Scientific. Jakost struje iznosila je 5-7 V/cm gela, a elektroforeza je trajala dok fronta boje nije stigla do donjeg ruba gela. Nakon toga, gelovi su prebačeni u kadice s vodenom otopinom etidijevog bromida (1%, w:v). Etidij bromid ima afinitet nekovalentnog vezanja između baza na molekuli DNA, što se koristi za vizualizaciju molekula DNA u gelu. Nakon pola sata, gelovi su kratko isprani u vodi i zatim je DNA vizualizirana pod UV svjetlom pomoću aparata za mjerenje kemiluminiscencije i fluorescencije Alliance 4,7 (UVITEC Cambridge).

2.5. ANALIZA MASNIH KISELINA I LIPIDA

2.5.1. Ekstrakcija lipida

Za analizu masnih kiselina i lipida rađena je ekstrakcija lipida prema modificiranoj metodi po Folchu [171] iz ukupnog homogenata stanica uzgajanih u odgovarajućem tekućem mediju. Prethodno, stanice su isprane dva puta u 25 ml destilirane vode, centrifugirane na 3300 \times g 5 minuta, a talog stanica ekvivalentan OD₆₀₀ 20 ($\sim 20 \times 10^7$ stanica) pohranjen je na -80°C do ekstrakcije. Zamrznuti talog stanica otopljen je u 5 ml Folchove otopine (kloroform: metanol = 2:1, v:v), te je smjesa prebačena u staklene epruvete od 25 ml (Pyrex), u koje je prethodno dodano 1 ml staklenih kuglica (425-600 μ m). Za kvantitativno određivanje lipida, dodano je 50 μ l ~~raz~~vine standarda za fosfolipide (Avanti polar) i za neutralne lipide (Larodan) koncentracije, svaki po 0,05 mg/ml u smjesi (tablica 6). Prilikom ekstrakcije lipida za analizu masnih kiselina, nisu korišteni interni standardi, budući da su analizirani samo relativni udjeli masnih kiselina. Kako bi došlo do homogeniziranja stanica, uzorci su stavljeni na treskalicu (IKA) 30 minuta pri maksimalnoj brzini (nivo 10), u hladnoj komori na +4°C. Zatim je u uzorke dodano 1 ml vodene otopine magnezijevog klorida (0,034%, w:v), homogenizacija se nastavila još 10 minuta, te se odvajanje slojeva provelo centrifugiranjem 3 minute na 2000 \times g na +4°C. Gornja vodena faza je uklonjena pomoću vakuum sisaljke. U donju fazu je dodano 2 ml smjese otapala (MeOH:H₂O:CHCl₃, 48:47:3, v:v:v), nakon čega su

uzorci promiješani na električnoj miješalici i centrifugirani na $2000\times g$ 3 minute na $+4^{\circ}\text{C}$. Gornja vodena faza ponovno je uklonjena pomoću vakuuma sisaljke. Donja, organska faza pažljivo je otpipetirana u epruvete od 15 ml (Pyrex), te uparena u laminaru pod strujom plina dušika. Suhi ostatak lipida zamrznut je na -80°C za daljnju analizu sastava masnih kiselina ili je resuspendiran u 1 ml Folcheve otopine ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, 2:1, v:v) te pohranjen na -80°C .

Tablica 6. Popis internih standarda koji su korišteni za kvantitativno određivanje različitih lipidnih razreda i njihovih lipidnih vrsta. Za kvantitativno određivanje fosfatidil-inozitola korišteni su standardi fosfatidil-serina.

Lipidne vrste	koncentracija (mg/ml)
DAG 28:0	0.05
TAG 36:0	0.05
TAG 45:0	0.05
TAG 51:0	0.05
TAG 57:0	0.05
PC 24:0	0.05
PC 34:0	0.05
PC 38:0	0.05
PE 24:0	0.05
PE 34:0	0.05
PS 34:0	0.05
PA 24:0	0.05
PA 28:0	0.05
PA 34:0	0.05

2.5.2. Analiza masnih kiselina

Prije početka procesa transesterifikacije suhi ostatak lipida termostatiran je na sobnu temperaturu. U ovom radu korištena je alkalna transesterifikacija metanolom, koja se bazira na hidrolizi masnih kiselina u lipidima i nastanka metilnih estera slobodnih masnih kiselina [172]. U svaki uzorak dodano je 5 ml 0.5 M otopine kalijeve lužine u metanolu. Epruvete su zatvorene, te je smjesa miješana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodano po 5 ml n-heksana, i nakon mješanja, gornji organski sloj je pomoću staklene Pasterove pipete odvojen u čistu epruvetu te ispran dva puta s po 2,5 ml destilirane H_2O , na način da su uzorci miješani dok god nije došlo do odvajanja faza. Nakon ispiranja, uzorak je sušen s dodatkom natrijevog

sulfata (Na_2SO_4). Nakon filtriranja natrijev sulfat je uklonjen filtriranjem. Uzorci su upareni do suha pod strujom plina dušika te pohranjeni na -20°C do analize.

Metilni esteri masnih kiselina analizirani su primjenom plinskog kromatografa s plameno-ionizacijskim detektorom (Varian 450-GC). Suhi ostatak metilnih estera masnih kiselina otopljen je u $150\ \mu\text{l}$ n-heksana, a za analizu injektiran $1\ \mu\text{l}$. Za njihovo razdvajanje korištena je kapilarna kolona Stabilwax (Crossbond Carbowax polyethylene glycol; $60\ \text{m} \times 0,25\ \text{mm}$). Temperaturni režim kolone: povećanje temperature od 80°C do 250°C u 15 minuta, s brzinom porasta temperature $40^\circ\text{C}/\text{min}$. Temperatura injektora bila je 80°C , a temperatura detektora 250°C , uz plin nosač helij protoka $1,5\ \text{ml}/\text{min}$. Metilni esteri masnih kiselina identificirani su usporedbom s vremenima zadržavanja kromatograma komercijalno dostupnih standarda.

2.5.3. Analiza lipida

Za analizu lipida korišten je sustav UPLC-MS (engl. ultra performance liquid chromatograph (ACQUITY UPLC^R, Waters) - mass spectrometer (qTOF, Waters)). Lipidi su analizirani u dva različita moda; u negativnom modu analizirani su razredi PA, PC, PE, PI i PS, a u pozitivnom modu analizirani su razredi TAG, DAG i LPC. Za analizu lipida u negativnom modu, $150\ \mu\text{l}$ uzorka upareno je pod strujom plina dušika i zatim je suhi talog otopljen u $150\ \mu\text{l}$ otopine izopropanol : (CHCl_3 : MeOH, 2:1, v:v), (9:1, v:v). Injektirano je $10\ \mu\text{l}$ uzorka. Za analizu lipida u pozitivnom modu, $40\ \mu\text{l}$ uzorka otopljenog u CHCl_3 : MeOH (2:1, v:v) pomiješano je sa $160\ \mu\text{l}$ izopropanola, od čega je injektirano $5\ \mu\text{l}$. Kromatografsko razdvajanje postignuto je na koloni BEH C18, $2,1 \times 150\ \text{mm}$, $1,7\ \mu\text{m}$ (Waters), pomoću sustava binarnog gradijenta: otapalo A, ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH} = 1:1$, v:v) i otapalo B (izopropanol). Svako otapalo sadržavalo je 1% amonijevog acetata, 0,1% metanske kiseline i $8\ \text{mM}$ fosfatne kiseline, kako bi se poboljšali kromatogrami fosfatidil-serina i fosfatidilne kiseline [173]. Kromatografsko razdvajanje započelo je 45%-tnim udjelom otapala B, s linearnim povećanjem udjela otapala B do 90% nakon 30 minuta. U iduće 2 minute udio otapala B povećan je na 100%, što je zadržano idućih 10 minuta. Nakon toga sustav je vraćen na početne udjele otapala B (45%) tijekom 1 minute, i u tim uvjetima je kolona ekvilibrirana sljedećih 7 minuta, do analize idućeg uzorka. Analiza spektroskopije masa lipidnih vrsta rađena je pomoću hibridnog masenog spektrometra Synapt G1 (qTOF, Waters) u negativnom modu s naponom kapilare od $2,1\ \text{kV}$ (sampling cone: 45, extraction cone: 3, desolvation: 900

l/h, source: 100°C, desolvation: 400°C). Leucin enkefalin (100 pg/μl) u otopini voda : acetonitril 1:1 (v:v) i 0,1% metanske kiseline, korišten je kao referenca, kako bi se kompenzirali pomaci u kalibracijskom vremenu leta, te je injektiran pomoću vanjske pumpe (L-6200 intelligent pump, Hitachi) brzinom toka od 200 μl/min, podjeljeno u omjer 1:13. Kromatogrami lipidnih vrsta snimani su pomoću programa MassLynx V4.1 (Waters), a kvantifikacija lipidnih razreda i lipidnih vrsta napravljena je pomoću programa Lipid Data Analyzer (UniTech, Graz).

2.6. „SYNTHETIC GENETIC ARRAY “ – SGA

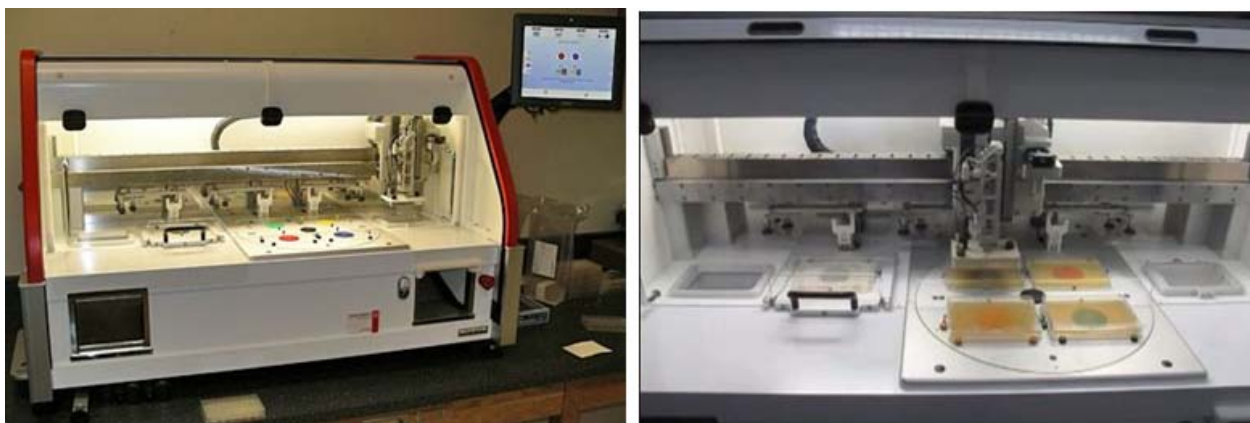
SGA je automatizirana genetska metoda kojom se omogućava identifikacija gena uključenih u određene metaboličke putove, u ovom radu konkretno putove metabolizama PUFA i lipidne peroksidacije. Sama metoda izvodi se križanjem osnovnog soja kvasca (s mutiranim genom koji se istražuje) s kolekcijom jednostrukih mutanata, kako bi se dobili dvostruki mutanti. Svrha ove metode je identificirati interakcije između dva gena, čiji nedostatak može rezultirati ubrzanom rastom, djelomičnom ili potpunom inhibicijom rasta te smrću stanice [174, 175]. Djelomična inhibicija rasta upućuje da se dva gena nalaze na sličnom metaboličkom putu koji utječe na istu staničnu funkciju. Ukoliko stanica nema alternativni put kojim bi nadoknadila gubitak funkcije ova dva gena, dolazi do zastoja rasta stanica i moguće smrti. U ovom radu, umjesto kreiranja dvostrukih endogenih mutanata, u kolekciju jednostrukih vijabilnih mutanata (4300 sojeva) unesen je strani gen za Δ12 desaturazu. Svrha pokusa bila je identifikacija ključnih gena, koji u stanicama kvasca sprječavaju toksičnost uzrokovanu prisutnošću PUFA; u fiziološkim uvjetima i uvjetima oksidacijskog stresa, odnosno lipidne peroksidacije.

2.6.1. Princip metode

Prvotnim križanjem soja Y7092desa (tip križanja MAT α) s kolekcijom jednostrukih mutanata (tip križanja MATa), te naknadnim uzastopnim koracima selekcije dobiveni su jednostruki mutanti koji imaju gen za Δ12 desaturazu („dvostruki“ mutanti). Genotipovi kolekcije mutanata i osnovnog soja (Y7092desa) dizajnirani su tako da posjeduju specifične genetske markere koji omogućavaju selekciju haploidnih „dvostrukih“ mutanata tipa križanja MATa. Osnovni soj i kolekcija mutanata auktotrofi su za sintezu histidina budući imaju

parcijalnu deleciju ovog gena (*his3Δ1*) i mogu rasti samo na podlozi s histidinom. Napomena: DNA fragment s genima za Δ12 desaturazu i kazetu natMX ugrađen je u lokusu *his3Δ1* u soju Y7092desa. Osnovni soj ima ugrađen gen *HIS5* (iz *S. pombe*), koji kodira za protein imidazolglicerol-fosfat dehidrogenazu, prvi enzim u biosintezi histidina, te je funkcionalni homolog gena *HIS3* kod *S. cerevisiae* i može ga zamijeniti. Međutim, gen *HIS5* nalazi se pod kontrolom promotora STE2pr, čija ekspresija je ovisna o tipu križanja, a eksprimira se isključivo u haploidnim stanicama tipa križanja MATa. Budući osnovni soj ima tip križana MATα, gen *HIS5* nije funkcionalan. Dalje, STE2pr-*his5* fragment nalazi se unutar deletiranog lokusa gena *CAN1*. Geni *CAN1* i *LYP1* kodiraju za enzime permeaze, koji dopuštaju ulazak kanavanina i tializina u stanicu. Kanavanin je toksični analog arginina, a tializin je toksični analog lizina. Divlji soj kvasca koji ima gene *CAN1* ili *LYP1* ne može rasti na podlogama s kanavaninom i/ili tializinom. Kolekcija mutanata ima funkcionalan gen *CAN1*, dok je gen *LYP1* mutiran i kod osnovnog soja i kod kolekcije mutanata. U različitim koracima selekcije, hranjive podloge sadrže kanavanin i tializin, što omogućava germinaciju stanica koje imaju mutirani *CAN1* lokus (*can1Δ*). Zaključno, stanice tipa križanja MATa, koje imaju genotip *can1:STE2pr-his5lyp1* (nastaju sporulacijom, odnosno rekombinacijom kromosoma tijekom mejoze), mogu rasti na podlozi s kanavaninom i tializinom i bez histidina. Stanice tipa križanja MATα ne mogu rasti na ovoj podlozi, zbog represije promotora STE2pr. Diploidne stanice (MATa/α) pokazuju ekspresiju promotora STE2pr, ali im je rast ~~čak~~ inhibiran, budući imaju gen *CAN1*, koji dopušta ulazak kanavanina u stanicu.

Za izradu ove metode, korištene su četvrtaste pločice (PLUSPLATE[®] dishes, Singer Instruments), koje su kompatibilne s robotskim replikatorom (RoTor HDA, Singer Instruments, slika 13). Ovakve pločice, s odgovarajućom selektivnom podlogom s agarom korištene su za automatizirano presađivanje kolonija, za što su korišteni nastavci Short-pin repad u formatu 384 ili 1536 kolonija (Singer Instruments).



Slika 13. Fotografije automatskog replikatora (RoTor HDA, Singer Instruments) kakav je korišten za replikaciju kolonija prilikom izrade metode SGA.

2.6.2. Selekcija jednostrukih mutanata s genom za $\Delta 12$ desaturazu

Soj Y7092desa uzgojen je preko noći u 5 ml tekućeg medija (YEPD+clonNAT). Prekonoćna kultura izlivena je na YEPD agaroznu podlogu, a stanice su presađene na tri nove YEPD agarozne pločice u formatu 384 kolonije (24×16) te su ostavljene u inkubatoru preko noći na 30°C . Točan sastav medija korištenih u daljnjim koracima selekcije opisan je u poglavlju 2.1.3., a proces selekcije prikazan je na slici 14.

Korak 1: Parenje

Tri ploče sa sojem Y7092desa korištene su za križanje s kolekcijom mutanata, na način da su prvo presađeni mutanti, a zatim soj Y7092desa na istu pločicu s medijem YEPD. Kompletna kolekcija nalazi se na 14 pločica. Ploče su inkubirane 1 dan na sobnoj temperaturi.

Korak 2: Selekcija zigota

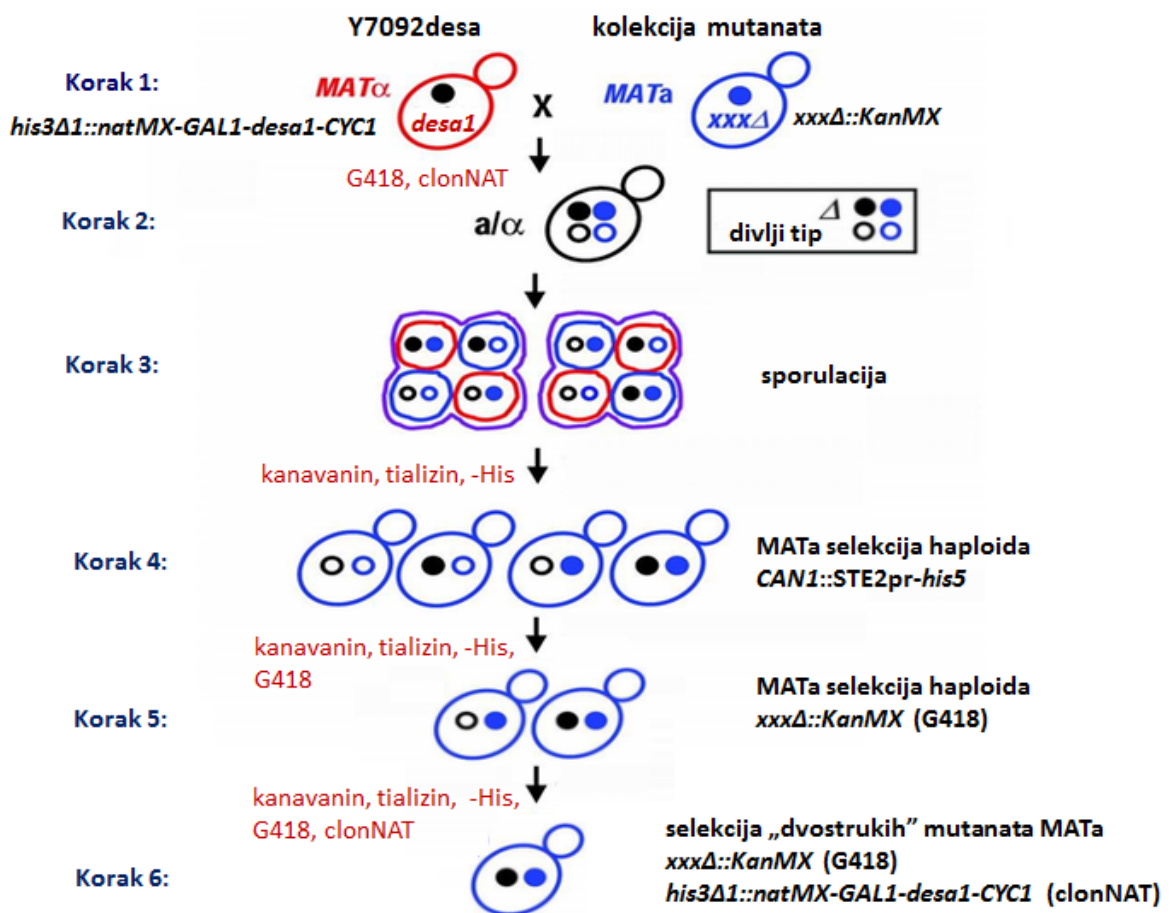
Kolonije iz prethodnog koraka presađene su na pločice sa selektivnim medijem YEPD+clonNAT+G418, koja osigurava rast diploida nastalih križanjem. Stanice su uzgajane u inkubatoru 2 dana na 30°C .

Korak 3: Sporulacija

Diploidni sojevi iz prethodnog koraka presađeni su na podloge sa smanjenim udjelom glukoze i izvora dušika, što potiče sporulaciju i formaciju tetrada. Stanice su uzgajane u inkubatoru 5 dana na 20°C .

Korak 4: Selekcija haploida (MATa)

Spore iz prethodnog koraka presađene su na pločice sa selektivnim medijem SD-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin, koji osigurava isključivo rast haploidnih stanica tipa križanja MATa. Stanice su uzgajane u inkubatoru 2 dana na 30°C. Nedostatak aminokiselina arginina i lizina stvara pojačan pritisak za ugradnju njihovih toksičnih analoga kanavanina i tializina iz podloge u diploidne stanice, a nedostatak histidina osigurava preživljavanje haploidnih stanica tipa križanja MATa, koje imaju genotip *CAN1::STE2pr-His5*.



Slika 14. Pregled potrebnih koraka selekcije u metodi SGA, pomoću kojih se na kraju selektiraju „dvostruki“ mutanti, odnosno jednostruki mutanti s genom za $\Delta 12$ desaturazu.

Korak 5: Selekcija jednostrukih mutanata (MATa)

Haploidne stanice (MATa) iz prethodnog koraka presađene su na selektivni medij SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418, koji osigurava isključivo rast haploidnih

stanica tipa križanja MATa, koje imaju kazetu *KanMX* na mjestu mutiranog gena. Stanice su uzgajane u inkubatoru 2 dana na 30°C.

Korak 6: Selekcija „dvostrukih“ mutanata (MATa)

Haploidne stanice (MATa) koje imaju kazetu *KanMX* na mjestu mutiranog gena iz prethodnog koraka presađene su na selektivnu podlogu SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT, koji osigurava isključivo rast haploidnih stanica tipa križanja MATa, koje imaju kazetu *KanMX* na mjestu mutiranog gena i kazetu *natMX* spojenu na gen za desaturazu $\Delta 12$. Glukoza osigurava represiju gena za $\Delta 12$ desaturazu. U ovom koraku kolonije su nasađene u formatu 1536, kako bi se dobili tehnički kvadriplikati svakog soja. Stanice su ostavljene u inkubatoru 2 dana na 30°C, nakon čega su ploče skenirane za računalnu analizu rasta kolonija (kontrola).

Korak 7: Ispitivanje učinka PUFA na rast jednostrukih mutanata

Haploidne stanice tipa križanja MATa, koje imaju kazetu *KanMX* na mjestu mutiranog gena i kazetu *natMX* spojenu na gen za desaturazu $\Delta 12$, iz prethodnog koraka, replicirane su na selektivni medij SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT. Umjesto glukoze, kao izvor ugljikohidrata dodana je galaktoza, kako bi se inducirala ekspresija gena za $\Delta 12$ desaturazu i sinteza PUFA. Kao i u prethodnom koraku kolonije su presađene u formatu 1536, kako bi se dobili tehnički kvadriplikati svakog soja. Stanice su uzgajane u inkubatoru 2 dana na 30°C, nakon čega su ploče skenirane za računalnu analizu rasta kolonija.

Korak 8: Ispitivanje učinka oksidacijskog stresa na rast jednostrukih mutanata s i bez PUFA

Kolonije iz koraka 6 presađene su u formatu 1536 na selektivne ploče SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT + tBH. Kao izvor ugljikohidrata korištena je glukoza; na ovaj način ispitan je utjecaj oksidacijskog stresa na jednostruke mutante, budući je sinteza PUFA inhibirana prisutnošću glukoze. Kolonije iz koraka 7. replicirane su u formatu 1536 na selektivne ploče SD/MSG-His/Arg/Lys + kanavanin/tializin/G418/clonNAT + tBH. Kao izvor ugljika korištena je galaktoza kako bi se osigurala stalna ekspresija gena za $\Delta 12$ desaturazu; na ovaj način ispitan je utjecaj oksidacijskog stresa na jednostruke mutante u prisustvu PUFA. U oba slučaja stanice su inkubirane 24 sata, nakon čega su ploče skenirane za računalnu analizu rasta kolonija.

2.6.3. Obrada rezultata

Fotografije skeniranih ploča obrađene su pomoću programa ImageJ (National Institutes of Health), na način da je izračunata prosječna površina tehničkih kvadrilikata kolonija. Izračunat je koeficijent rasta za svaki soj, na način da je podijeljena vrijednost prosječne površine svakog soja s prosječnom vrijednosti svih kolonija pojedine ploče. Zatim, za svaki soj, podijeljena je vrijednost koeficijenta rasta na mediju s galaktozom (Kgal) sa koeficijentom rasta na mediju sa glukozom (Kglu). Pomoću dobivene vrijednosti procijenio se učinak PUFA na rast mutanata (K1). U obzir su uzeti samo sojevi na podlogama s glukozom čiji je koeficijent rasta (Kglu) bio iznad 50% prosječne vrijednosti površina kolonija svake ploče, te sojevi na podlogama s galaktozom čiji koeficijent rasta (Kgal) je bio ispod 50% prosječne vrijednosti površine kolonija svake ploče. Na isti način izračunat je koeficijent rasta sojeva na podlozi s tBH u odnosu na rast sojeva na podlozi bez tBH; posebno na glukozu (K2) i na galaktozi (K3). Pomoću dobivenih vrijednosti procijenio se učinak oksidacijskog stresa na rast jednostrukih mutanata s i bez PUFA. Kako bi se procijenio učinak tBH na rast jednostrukih mutanata u prisutnosti PUFA u odnosu na rast jednostrukih mutanata u prisutnosti tBH, podjeljen je koeficijent rasta K3 s koeficijentom rasta K2. Dobivena vrijednost, označena kao K4, korištena je za procijenu osjetljivosti jednostrukih mutanata na oksidacijski stres, isključivo kao posljedice prisutnosti PUFA. Mutirani geni u sojevima koji su pokazali smanjeni rast, bilo na podlozi s galaktozom ili podlozi s galaktozom i tBH, svrstani su pomoću programa „SGD Gene Ontology Slim Mapper“, dostupnog na internetskoj stranici (www.yeastgenome.org) prema staničnim procesima (engl. „Cellular process“).

2.7. POTVRDA FENOTIPOVA I SOJEVA DOBIVENIH METODOM SGA

2.7.1. Potvrda mutanata metodom PCR

Budući su velike kolekcije sojeva poput ovih korištenih u metodi SGA podložne greškama i zamjenama sojeva od strane dobavljača, bilo je potrebno nakon izvođenja metode potvrditi vjerodostojnost dobivenih sojeva i fenotipova. U tu svrhu metodom PCR na kolonijama (opisano u poglavlju 2.4.3) potvrđeni su genotipovi, odnosno potvrđena je delecija gena u jednostrukim mutantima s genom za $\Delta 12$ desaturazu. **Budu** deletirani geni u jednostrukim mutantima zamijenjeni s kasetom *KanMX*, za sve mutante korištena je

univerzalna DNA početnica koja prepoznaje regiju unutar kazete *KanMX* (*Kanmx4rev*). Druga početnica, koja prepoznaje regiju uzvodno od deletiranog gena, specifična je za svaki gen te je posebno dizajnirana za svaki soj (*XXXfwd*). Također, kao kontrola, korištena je i treća početnica koja prepoznaje regiju unutar funkcionalnog gena, kako bi se isključila mogućnost kontaminacije kulture s drugim sojevima (*XXXrev*). Popis DNA početnica koje su korištene za potvrdu sojeva nalaze se u tablici 7.

2.7.2. Potvrda fenotipova

Budući je ekspresija gena *zaΔ12* desaturazu inhibirana glukozom, u metodi SGA kao kontrola korišteni su „dvostruki“ mutanti na mediju s glukozom ili glukozom i *tert*-butil hidroperoksidom; funkcionalni jednostruki mutanti. Međutim, galaktoza kao izvor ugljikohidrata, osim što u korištenom sustavu inducira ekspresiju $\Delta 12$ desaturaze, inducira drugačije stanične odgovore i samim time drugačije utječe na rast pojedinih jednostrukih mutanata u odnosu na njihov rast na mediju s glukozom [176, 177]. Kako bi se eliminirali potencijalno lažni fenotipovi, koji su se mogli javiti kao posljedica utjecaja galaktoze, rast pojedinih „dvostrukih“ mutanata (jednostruki mutanti u prisutnosti PUFA) uspoređen je s rastom jednostrukih mutanata iz originalne kolekcije na pločama s galaktozom (fiziološki uvjeti) ili na pločama s galaktozom i *tert*-butil hidroperoksidom. Na taj način eliminirana je moguća interferencija same galaktoze na rast jednostrukih mutanata, odnosno fenotipovi su pripisani isključivo utjecaju PUFA. Također, u svrhu lakše obrade rezultata, korišten je magistarski rad Christophera Uschinga, u kojem je napravljena analiza utjecaja galaktoze na rast kompletne kolekcije jednostrukih mutanta; ovaj magistarski rad napravljen je u laboratoriju Prof. Kohlweina, kao i metoda SGA u ovom radu.

Tablica 7. Popis DNA početnica koje su korištene za potvrdu genotipova jednostrukih mutanata s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu, dobivenih metom SGA.

DNA početnica	Sekvenca
Kanmx4rev	5'-GAAACAACCTCTGGCGCATCG-3'
BSD2 fwd	5'-CGTGTTATACGATGCGGAGTC-3'
BSD2 rev	5'-GTCCTCTATGCTATCTTCCTCG-3'
GLR1 fwd	5'-GACGTCACCTAGTAAGCACGAC-3'
GLR1 rev	5'-GCTTCAACTAGTAATGTCTTCGC-3'
GRX1 fwd	5'- CTCCTGATTCACGTGATGTGG -3'
GRX1 rev	5'- CGCAGCCTGAATGTCTGCG -3'
MXR2 fwd	5'- GCTATCTCTGCTAGTACGACC -3'
MXR2 rev	5'- CACCATCAGCTGCAATGGTG -3'
VPS24 fwd	5'- CTGCGGTTCCAATGGAATGG -3'
VPS24 rev	5'- CCTAACATCGTTCCTTCTTTGCAG -3'
DNF1 fwd	5'- CCGAAGGTCATCGTAATACGC -3'
DNF1 rev	5'- CATCATTGAAGCTGACCTGTGG -3'
LEM3 fwd	5'- GGTAGTATGTGTCCAATGTTGTAG -3'
LEM3 rev	5'- ACGCACAGGCTTTACTTCATCC -3'
SRO7 fwd	5'- AGAGCAAGCAATACTATTTCTGAC -3'
SRO7 rev	5'- CGATCGGTTTACTGCTCATCC -3'
RAS1 fwd	5'- GTACGGTGTCTCTATTATCATCTG -3'
RAS1 rev	5'- CTCATGTACTGTTCTCTCATCGC -3'
RAS2 fwd	5'- CAAGCGTAACGCAATCCGGC -3'
RAS2 rev	5'- CTTCTGCCCTGCAGTATCC -3'
RCY1 fwd	5'- CGAAATATTTTCGTTGAAGGAAGG -3'
RCY1 rev	5'- CTGTTGGAGACCCATTCTAGTC -3'
ROD1 fwd	5'- TTGTATGGCTGGGCTCTTGCA -3'
ROD1 rev	5'- GCCAAAGACTTGATTTGAATTGGC-3'
VPS74 fwd	5'- CCACGCTAACAAATAGAGCT -3'
VPS74 rev	5'- CTCTCAATTTTCGATTCTTCTG -3'
TSA2 fwd	5'- GAGTAATCAAGGATCAACTATGG -3'
TSA2 rev	5'- GCAACAATCTCAGTTGGACAG -3'
RCF2 fwd	5'- GGCCTCAACCCTTGCTTCC -3'
RCF2 rev	5'- GACCATGTTAGAGTCGAAGGC-3'

2.7.2.1. Test na pločama

Kako bi se potvrdile razlike u rastu izabranih „dvostrukih“ mutanata dobivenih metodom SGA u odnosu na rast jednostrukih mutanata iz originalne kolekcije, sojevi su uzgajani u tekućem mediju SD s glukozom (2%) preko noći do eksponencijalne faze ($OD_{600} \sim 3,0$). Stanice su isprane vodom te su napravljena serijska razrjeđenja stanica u mikrotitarskim pločicama (OD_{600} 1,0, 0,5, 0,25 i 0,1). Zatim su stanice nasadene na agarozne SD ploče s galaktozom (2%). Stanice su inkubirane dva dana, nakon čega su ploče skenirane za računalnu analizu.

Za potvrdu fenotipova ovisno tretmanu *tert*-butil hidroperoksidom, „dvostruki“ i jednostruki mutanti uzgajani 2 dana na krutoj SD podlozi s galaktozom (2%), kako bi se osigurala akumulacija PUFA u „dvostrukim“ mutantima. Zatim, pojedinačne kolonije inokulirane su u tekući SD medij s galaktozom (2%), izmjeren je OD_{600} , te su sojevi razrijeđeni na OD_{600} 0,2 u svježi SD medij s galaktozom (2%) u pločicama s 24 bunarčića. Stanice su inkubirane do eksponencijalne faze rasta ($OD_{600} \sim 3,0$) i zatim su napravljena serijska razrjeđenja (OD_{600} 1,0 i 0,5) u mikrotitarskim pločicama. Stanice su nasadene na krute SD podloge s galaktozom (2%) i različitim koncentracijama *tert*-butil hidroperoksida (0,4 mM i 0,6 mM). Stanice su uzgajane u inkubatoru 24 sata, nakon čega su ploče skenirane za računalnu obradu.

2.7.2.2. „Bioscreen“

Za određene mutante, koji su pokazali razliku u rastu, ovisno o tretmanu *tert*-butil hidroperoksidom u prisutnosti PUFA, napravljena je dodatna analiza, gdje se pratio rast sojeva u tekućem mediju. Za ovaj pokus korišten je aparat koji ima funkciju inkubatora, čitača pločica i treskalice, BIOSCREEN C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd). Ovaj aparat spojen je na računalo, koje kontrolira zadane parametre i bilježi izmjerene vrijednosti. Stanice su inkubirane u mikrotitarskim pločicama u formatu 10 x 10 (100 bunarčića), u takozvanom „Honeycomb“ formatu.

Sojevi su uzgajani u tekućem SD mediju s glukozom (2%), preko noći, do eksponencijalne faze ($OD_{600} \sim 3,0$), nakon čega su isprane vodom te su nasadene kao OD_{600} 0,1 u SD medij s galaktozom (2%), u volumenu 400 μ l po bunariću. Rast stanica praćen je do stacionarne faze rasta, mjerenjem optičke gustoće staničnih kultura (OD_{600}), pri temperaturi 30°C, uz intenzivno miješanje pločica svakih 2 minute. Kao kontrola, na isti način analiziran je rast

stanica na SD mediju s glukozom (2%), koja inhibira ekspresiju $\Delta 12$ desaturaze. Za tretman *tert*-butil hidroperoksidom, stanice su uzgajane 48 sati na krutom SD mediju s galaktozom (2%), kako bi se osigurala akumulacija PUFA u „dvostrukim“ mutantima. Zatim, kolonije su inokulirane u tekući SD medij i razrijeđene na OD₆₀₀ 0,1 u mikrotitarskim pločicama te su tretirane s dvije koncentracije *tert*-butil hidroperoksida (0,5 i 0,7 mM). Rast stanica praćen je do stacionarne faze, mjerenjem optičke gustoće staničnih kultura (OD₆₀₀), pri temperaturi 30°C, uz intenzivno miješanje pločica svakih 2 minute.

2.8. STATISTIČKA ANALIZA

Svi pokusi rađeni su u triplicatima, a dobivene vrijednosti prikazane su kao srednje vrijednosti (mean value). Usporedba dobivenih srednjih vrijednosti provedena su pomoću dvosmjernog Studentovog testa koristeći program Astute (Leeds University) za Excell 5.0. Vrijednosti $p < 0,05$ uzete su kao pokazatelj statističke značajnosti razlika.

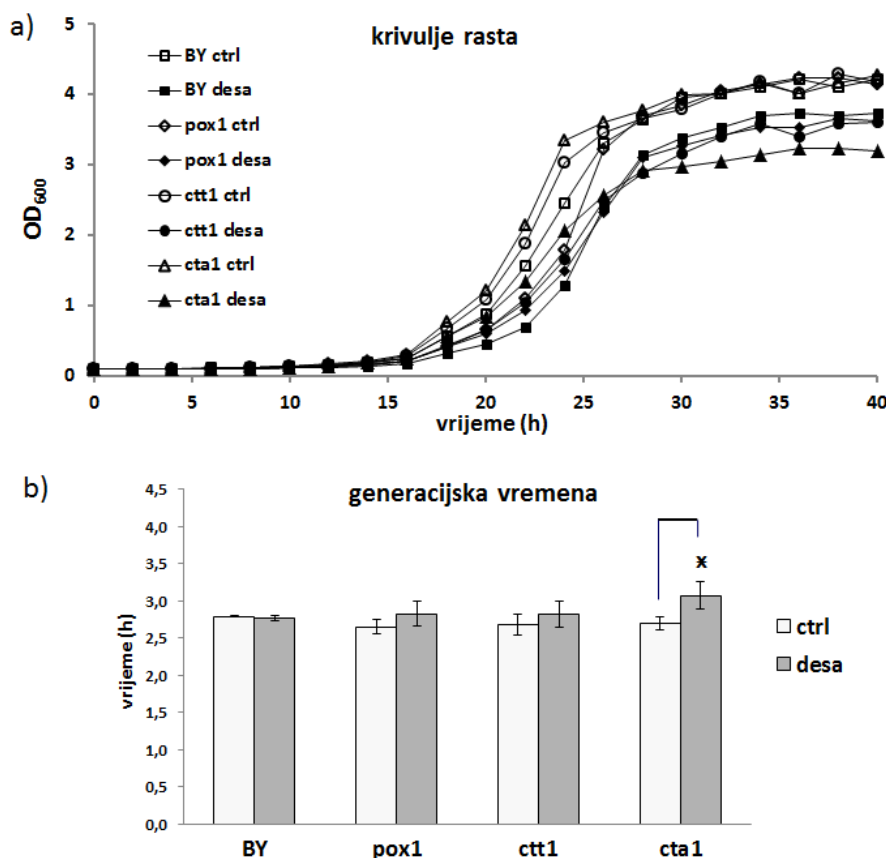
Obrada podataka za metodu SGA opisana je u poglavlju koje opisuje samu metodu radi posebnosti obrade ovakvih podataka.

3. REZULTATI

3.1. ULOGA β -OKSIDACIJE U ADAPTACIJI NA PRISUTNOST PUFA

3.1.1. Fiziologija rasta i proizvodnja ROS-a

Kako bi se istražio utjecaj PUFA na staničnu fiziologiju, analiziran je rast izabranih sojeva u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (Slika 15a).



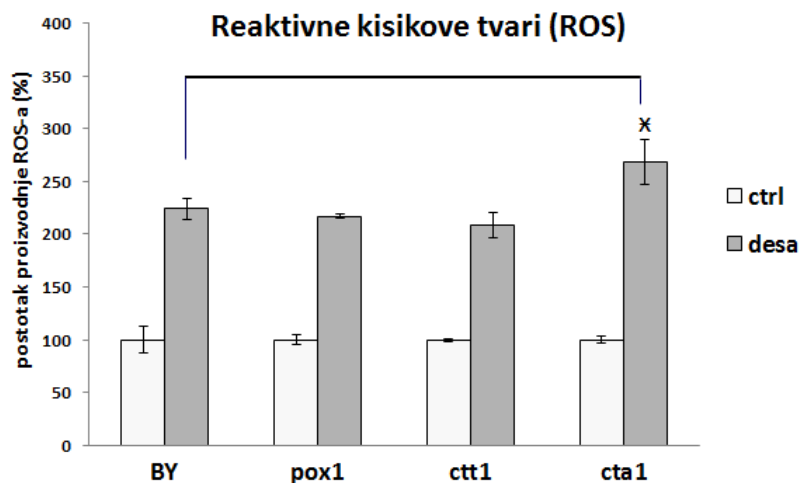
Slika 15. Prikazana je krivulja rasta sojeva u uvjetima indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu u mediju s galaktozom (a) te su uspoređena generacijska vremena sojeva u prisutnosti PUFA u odnosu na njihove kontrole u logaritamskoj fazi rasta (b).

* - statistički značajna razlika u odnosu na svoju kontrolu ($p < 0,05$).

Promjena izvora vrste šećera u hranjivom mediju, glukoze za galaktozu, uzrokuje prilagodbu stanica za koju je karakterističan duži period zastoja rasta stanica (lag faza), prije nego što stanice uđu u intenzivnu fazu diobe (eksponencijalna ili logaritamska faza rasta). Iz krivulje rasta vidljivo je da je prisutnost PUFA uzrokovala duži period prilagodbe kod svih sojeva (uključujući i kontrolni soj BYdesa). Međutim, u logaritamskoj fazi rasta prisutnost PUFA nije uzrokovala promjene u vremenu diobe stanica (generacijsko vrijeme, Slika 15b); jedino je soj bez peroksisomalne katalaze A (*cta1desa*) pokazao duže generacijsko vrijeme u

odnosu na svoju kontrolu ($p < 0,05$). Također, prisutnost PUFA uzrokovala je raniji prekid logaritamske faze, te su stanice pokazale manji prinos u stacionarnoj fazi ($OD_{600} \sim 3,5$) u odnosu na sojeve s praznim plazmidom pYES2 ($OD_{600} 4,0$). Soj *cta1desa* imao je još niži prinos od ostalih ispitanih sojeva ($OD_{600} 3,0$).

Budući je od prije poznato da PUFA uzrokuju povećanu proizvodnju unutarstaničnog ROS-a u kontrolnom soju (BYdesa) [178], cilj je bio vidjeti, da li prisutnost PUFA u izabranim mutantima uzrokuje dodatno povećanje ROS-a. Rezultati su prikazani na slici 16.



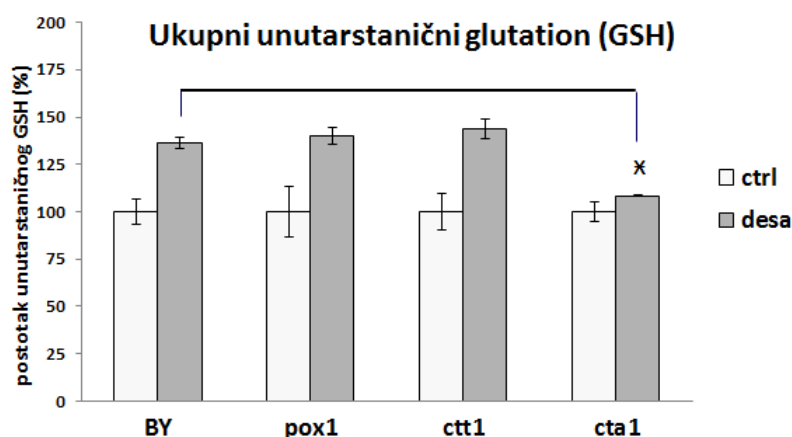
Slika 16. Kako bi se jasnije prikazale razlike utjecaja PUFA na proizvodnju ROS-a među sojevima, rezultati su prikazani kao postotci izmjerenih relativnih jedinica fluorescencije (RFU = eng. Relative Fluorescence Units) u sojevima koji proizvode PUFA u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2. RFU vrijednosti sojeva s praznim plazmidom pYES2 prikazane su kao 100%.

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni soj (BYdesa), $p < 0,05$.

Kao što se očekivalo, PUFA su uzrokovale značajno povećanje ROS-a kod svih sojeva ($p < 0,05$), međutim najveće povećanje ROS-a izmjereno je kod soja *cta1desa*, statistički značajno u odnosu na kontrolni soj BYdesa ($p < 0,05$). Glavna uloga katalaze A je uklanjanje vodikovog peroksida nastalog prilikom razgradnje masnih kiselina. Povećanje ROS-a u ovom mutantu moguća je posljedica indukcije β -oksidacije u prisutnosti PUFA te smanjenog uklanjanja nastalog H_2O_2 u ovom procesu bez funkcionalne katalaze A. Posljedično tome, povećanje ROS-a u soju *cta1desa* mogući je uzrok dužem generacijskom vremenu u logaritamskoj fazi te nižem prinosu u stacionarnoj fazi (Slika 15). Međutim, prisutnost PUFA u soju bez funkcionalne β -oksidacije (*pox1desa*), slično kao i u soju bez citoplazmatske katalaze T (*ctt1desa*), nije uzrokovala dodatno povećanje ROS-a u odnosu na soj BYdesa.

3.1.2. Antioksidacijski odgovori

Budući PUFA utječu na povećanje ROS-a, što posljedično može uzrokovati indukciju antioksidacijske zaštite, sljedećim nizom eksperimenata ispitano je da li u prisutnosti PUFA dolazi do indukcije nekih sustava antioksidacijske zaštite stanica. Također, cilj je bio vidjeti da li PUFA u izabranim mutantima uzrokuju promjene u indukciji antioksidacijske zaštite u odnosu na soj BYdesa. Za početak analizirana je koncentracija ukupnog unutarstaničnog glutationa (Slika 17.)



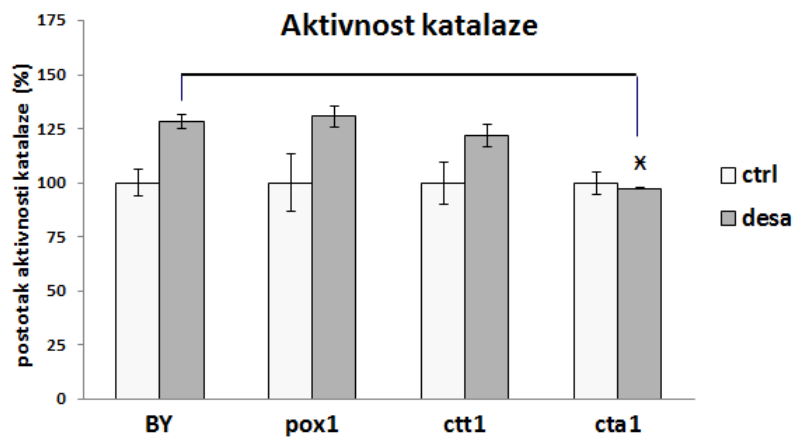
Slika 17. Ovisnost koncentracije GSH u sojevima koji proizvode PUFA (desa) u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2 (ctrl). Rezultati su prikazani kao postotci koncentracija GSH (nmol/mg proteina) u sojevima koji proizvode PUFA u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2. Koncentracija GSH u svim sojevima s praznim plazmidom pYES2 prikazana je kao 100%. %.

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni soj (BYdesa), $p < 0,05$.

Prisutnost PUFA uzrokovala je povećanje ukupnog unutarstaničnog glutationa u svim ispitanim sojevima ($p < 0,05$), osim u soju bez peroksisomalne katalaze A, što bi posljedično mogao biti uzrok povećanju ROS-a u ovom soju u odnosu na soj BYdesa. Povećanje glutationa u navedenim sojevima potvrdilo je njegovu bitnu ulogu u zaštiti stanice u uvjetima povećanog ROS-a, odnosno potencijalnih oksidacijskih oštećenja molekula, uključujući i PUFA. Međutim, sojevi *pox1*desa i *ctt1*desa nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni soj BYdesa, što je u korelaciji s izmjerenim povećanjem ROS-a, gdje također nije zabilježena razlika u odnosu na soj BYdesa.

Nadalje, u izabranim sojevima analizirana je ukupna katalazna aktivnost, koja je u prijašnjem radu pokazala ulogu u adaptaciji na prisutnost PUFA [178]. Treba naglasiti da je u

mutantima *ctl1* i *cta1* mjerena aktivnost samo jedne katalaze. Rezultati su prikazani na slici 18.



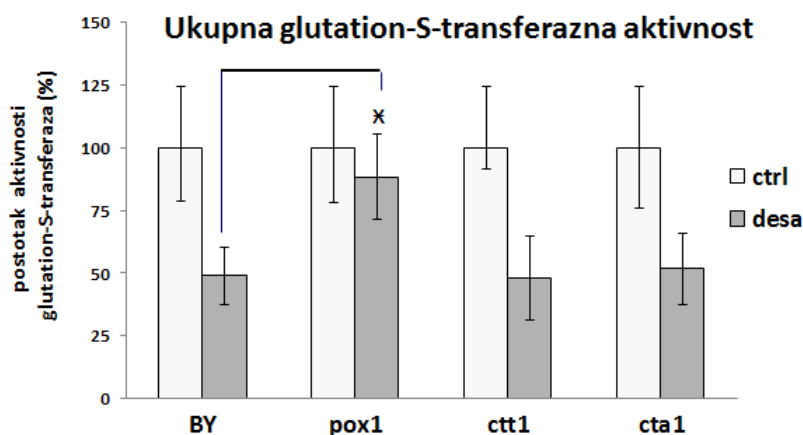
Slika 18. Ovisnost aktivnosti katalaze u sojevima koji proizvode PUFA (desa) u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2 (ctrl). Rezultati su prikazani kao postoci aktivnosti katalaze (U/mg proteina) u sojevima koji proizvode PUFA u odnosu na njihove kontrole. Katalazna aktivnost svakog kontrolnog soja prikazana je kao 100%.

* - statistički značajna razlika u odnosu na divlji tip (BYdesa), $p < 0,05$.

U korelaciji s povećanjem GSH, izmjereno je povećanje ukupne aktivnosti katalaza u staničnom odgovoru na prisutnost PUFA u sojevima BYdesa i *pox1*desa ($p < 0,05$). Ovaj rezultat potvrdio je ulogu katalaza u antioksidacijskom odgovoru stanica kvasca na povećanje ROS-a u prisutnosti PUFA. Međutim, soj bez funkcionalne -oksidacije nije pokazao značajnu razliku u aktivnosti katalaze u odnosu na soj BYdesa, što je u korelaciji s izmjerenim ROS-om i glutathionom. U sojevima *ctl1*ctrl i *ctl1*desa, izmjerene vrijednosti bile su do 10 puta niže nego u ostalim sojevima, što je posljedica nedostatka citoplazmatske katalaze T. Međutim, izmjereno povećanje aktivnosti katalaze u soju *ctl1*desa ($p < 0,05$) može se pripisati indukciji peroksisomalne katalaze A. Prisutnost PUFA nije uzrokovala povećanje aktivnosti citoplazmatske katalaze u soju *cta1*desa, što je u korelaciji s izmjerenim GSH, te također može biti uzrok izmjerenom povećanju ROS-a u ovom soju u odnosu na soj BYdesa.

U konačnici, izmjerena je ukupna glutathion-S-transferazna aktivnost u navedenim sojevima, a rezultati su prikazani na slici 19. Zanimljivo, prisutnost PUFA uzrokovala je sniženje glutathion-S-transferazne aktivnosti u sojevima BYdesa, *ctl1*desa i *cta1*desa u odnosu na njihove kontrole ($p < 0,05$), međutim nije bilo razlike u navedenim u mutantima u usporedbi sa sojem BYdesa. Prisutnost PUFA nije uzrokovala promjenu glutathion-S-transferazne

aktivnosti u soju bez funkcionalne β -oksidacije. Ovaj rezultat je zanimljiv, prvenstveno iz razloga što je sustav glutathion-S-transferaza, u čiji je mehanizam djelovanja uključen i GSH, bitan u detoksifikaciji produkata lipidne peroksidacije koji su mogli nastati u uvjetima povećanog ROS-a i prisutnosti PUFA.



Slika 19. Ovisnost ukupne aktivnosti glutathion-S-transferaza u sojevima koji proizvode PUFA (desa) u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2 (ctrl). Rezultati su prikazani kao postotci ukupne glutathion-S-transferazne aktivnosti (U/mg) u sojevima koji proizvode PUFA u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2. Glutathion-S-transferazna aktivnost sojeva s praznim plazmidom pYES2 prikazana je kao 100%.

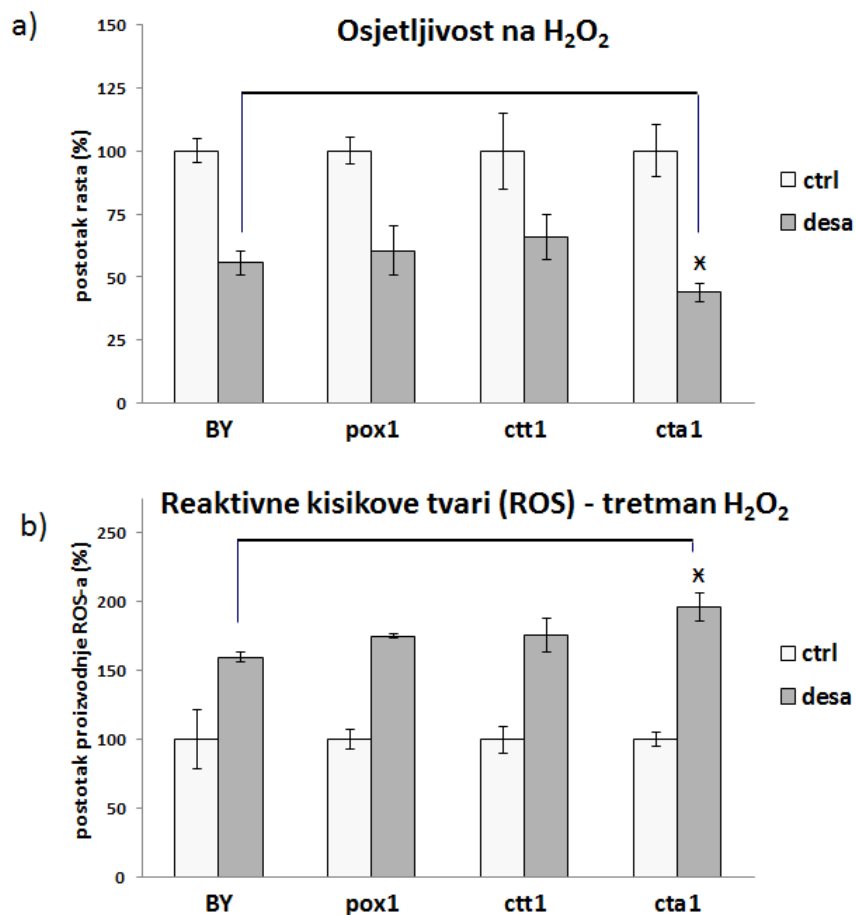
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni soj (BYdesa), $p < 0,05$.

3.1.3. Osjetljivost sojeva na oksidacijski stres

Prijašnjim radom pokazano je da prisutnost PUFA inhibira rast stanica kvasca ovisno o tretmanu različitim oksidansima, uključujući i H_2O_2 [160]. Kako bi ispitali da li PUFA u ispitivanim mutantima uzrokuje dodatno povećanje osjetljivosti na oksidacijski stres, stanice su tretirane vodikovim peroksidom, nakon čega je praćen zastoj u rastu stanica kroz 6 sati (slika 20a). Očekivano, svi sojevi ovisno o prisutnosti PUFA pokazali su povećanu osjetljivost na tretman H_2O_2 ($p < 0,05$). Međutim, soj *pox1*desa nije pokazao značajnu razliku u osjetljivosti u odnosu na soj BYdesa. Za razliku od mutanta bez citoplazmatske katalaze T, prisutnosti PUFA u mutantu bez peroksisomalne katalaze A uzrokovala je povećanje osjetljivosti na tretman H_2O_2 u odnosu na soj BYdesa ($p < 0,05$).

Također, kako bi ispitali da li je povećana osjetljivost sojeva na oksidacijski stres uzrokovana prisutnošću PUFA posljedica nemogućnosti stanica da održe oksido-redukcijsku homeostazu, analiziran je utjecaj H_2O_2 na proizvodnju unutarstaničnog ROS-a (slika 20b).

Tretman H_2O_2 uzrokovao je povećanu proizvodnju ROS-a u svim sojevima ovisno o prisutnosti PUFA ($p < 0,05$). Međutim, soj bez funkcionalne ω -oksidacije nije pokazao povećanu proizvodnju ROS-a u odnosu na soj BYdesa, što je u korelaciji s testom osjetljivosti na tretman H_2O_2 , gdje također nije izmjerena razlika. Nadalje, soj *cta1*desa pokazao je statistički značajno povećanje u proizvodnji ROS-a nakon tretmana H_2O_2 u odnosu na soj BYdesa ($p < 0,05$), za razliku od soja *ctt1*desa, što je također bilo u korelaciji je s izmjerenom osjetljivošću ovih sojeva na tretmana H_2O_2 .

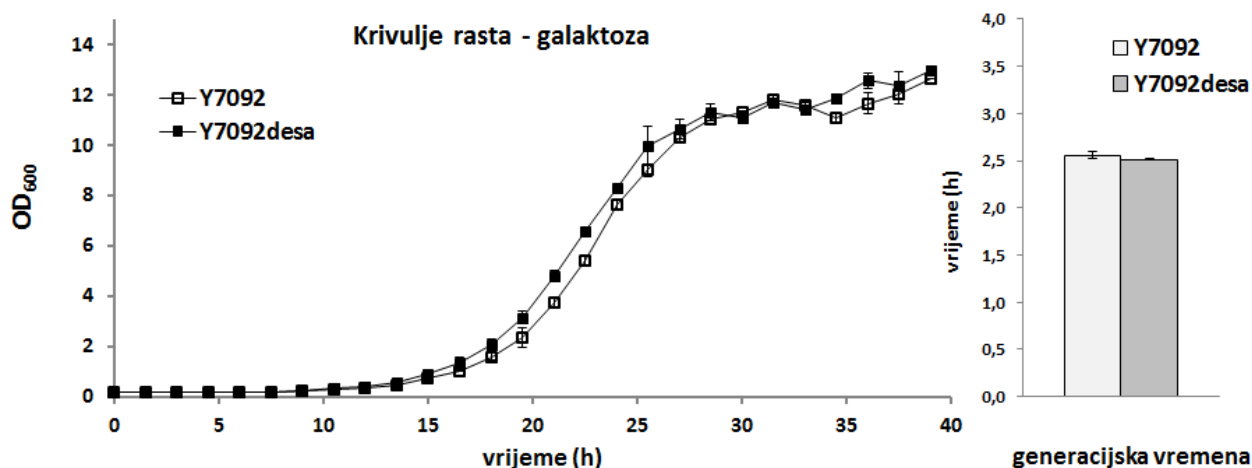


Slika 20. Rezultati testa osjetljivosti na oksidacijski stres prikazani su kao postoci staničnog rasta sojeva u prisutnosti PUFA u odnosu na isti soj s praznim plazmidom pYES2, izmjerene 6 sati nakon tretmana H_2O_2 . Postoci rasta tretiranih sojeva s praznim plazmidom pYES2 u odnosu na rast ne tretiranih sojeva prikazani su kao 100% (a). Rezultati proizvodnje ROS-a nakon tretmana H_2O_2 prikazani su kao postoci izmjerenih vrijednosti RFU u sojevima koji proizvode PUFA u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom pYES2, 2 sata nakon tretmana. RFU vrijednost svakog soja s praznim plazmidom pYES2 prikazana je kao 100% (b).

* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni soj (BYdesa), $p < 0,05$.

3.2. KARAKTERIZACIJA SOJA S KROMOSOMSKI UGRAĐENIM GENOM ZA $\Delta 12$ DESATURAZU

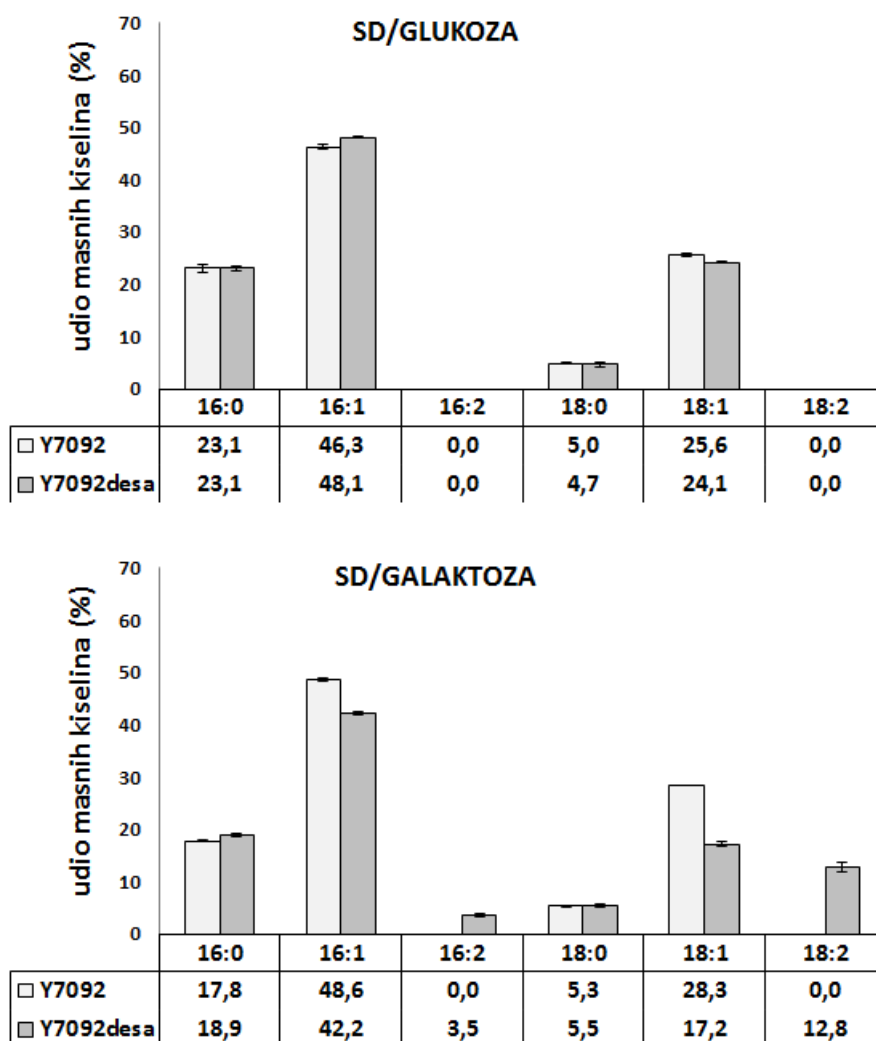
Za primjenu SGA metode kreiran je soj kvasca s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu. Kao i u slučaju ep isomalnog sustava (pYES2desa), gen za $\Delta 12$ desaturazu nalazio se pod kontrolom inducibilnog galaktoznog promotora (*GALI*). Međutim, za razliku od episomalnog sustava gdje je kao selekcijski marker korišten medij bez uracila (-ura), u slučaju kromosomske ugradnje, gen za $\Delta 12$ desaturazu bio je spojen na kazetu natMX, koja ovom soju daje rezistenciju na antibiotik clonNAT. Nakon selekcije soja Y7092desa na agaroznim pločama s clonNAT-om, potvrđena je ugradnja DNA fragmenta *natMX-GALI-desal-CYCI* u lokus *his3 Δ 1* metodom PCR. Nadalje, uspoređena je fiziologija rasta dobivenog soja Y7092desa s kontrolnim sojem Y7092 u mediju s galaktozom (slika 21). Iz krivulje rasta vidljivo je da stanice s i bez PUFA ne pokazuju značajne razlike, kako u vremenu rasta tako ni u generacijskim vremenima u logaritamskoj fazi rasta.



Slika 21. Prikazana je krivulja rasta kontrolnog soja (Y7092) i soja s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu (Y7092desa) u uvjetima indukcije u mediju s galaktozom. Generacijska vremena stanica u logaritamskoj fazi rasta su prikazana na slici desno.

Također, kako bi se potvrdila funkcionalna ekspresija gena za desaturazu, napravljena je analiza sastava masnih kiselina stanica u logaritamskoj fazi rasta, u mediju s glukozom i mediju s galaktozom (slika 22). Iz rezultata vidljivo je da u mediju s glukozom ne dolazi do sinteze PUFA, dok u mediju s galaktozom dolazi do akumulacije PUFA, kao posljedice indukcije $\Delta 12$ desaturaze. Linolna kiselina (18:2, ω -6) i heksadekadienska kiselina

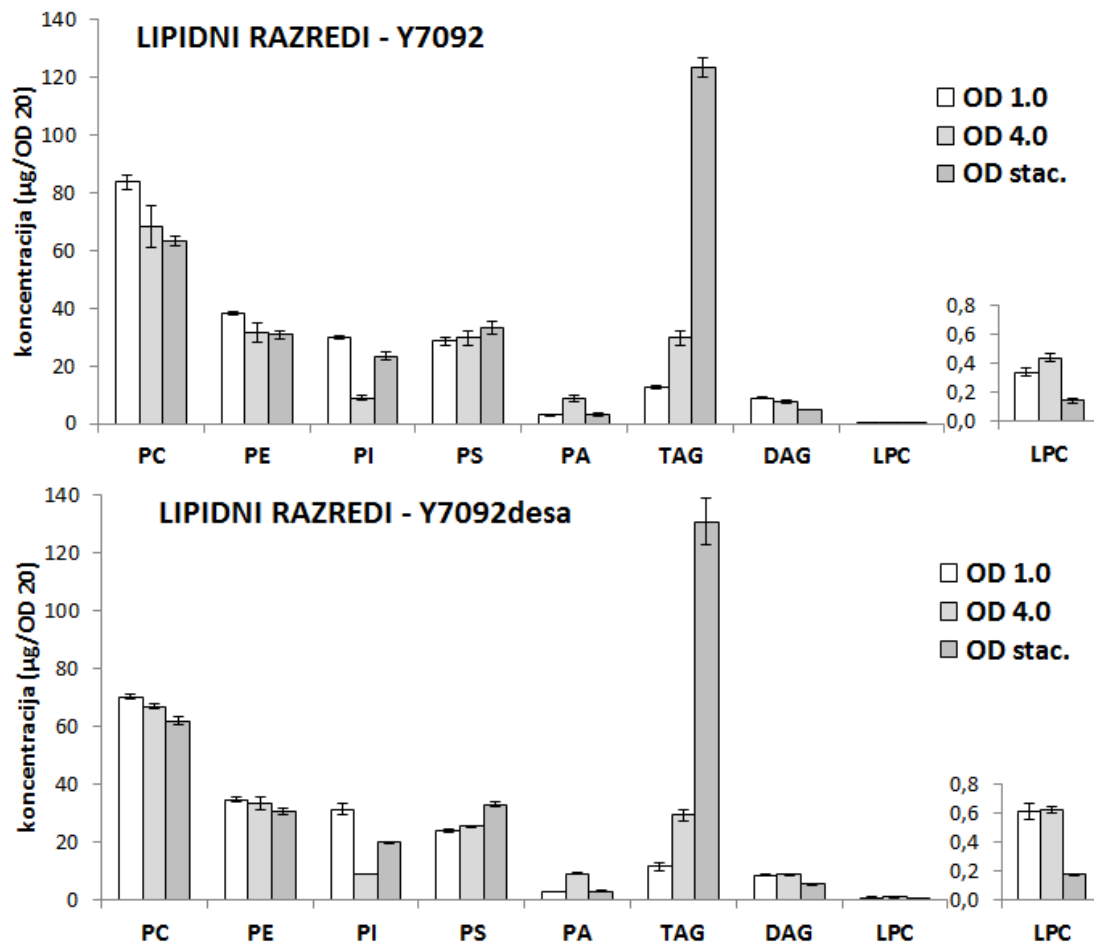
(16:2, ω -9) zastupljene su u sličnom rasponu relativnih udjela kao i u stanicama s episomalnom ekspresijom gena za Δ 12 desaturazu [160].



Slika 22. Prikazan je udio najzastupljenijih masnih kiselina u sojevima Y7092 i Y7092desa, u mediju s glukozom (gore) i mediju s galaktozom (dolje).

3.3. ANALIZA LIPIDA

Kako bi se istražile promjene u metabolizmu glicerofosfolipida i triacilglicerida tijekom prilagodbe stanica kvasca na prisutnost PUFA, napravljena je kvantifikacija osnovnih razreda glicerolipida i njihovih vrsta u tri različita vremena od početka indukcije gena za Δ 12 desaturazu. Za analizu lipidnog sastava korišten je soj Y7092desa, a kao kontrola korišten je soj Y7092. Analizirani su osnovni razredi glicerofosfolipida: PA, PC, PE, PS i PI, te neutralni lipidi TAG i DAG. Također, napravljena je kvantifikacija lizofosfatidilkolina (LPC).

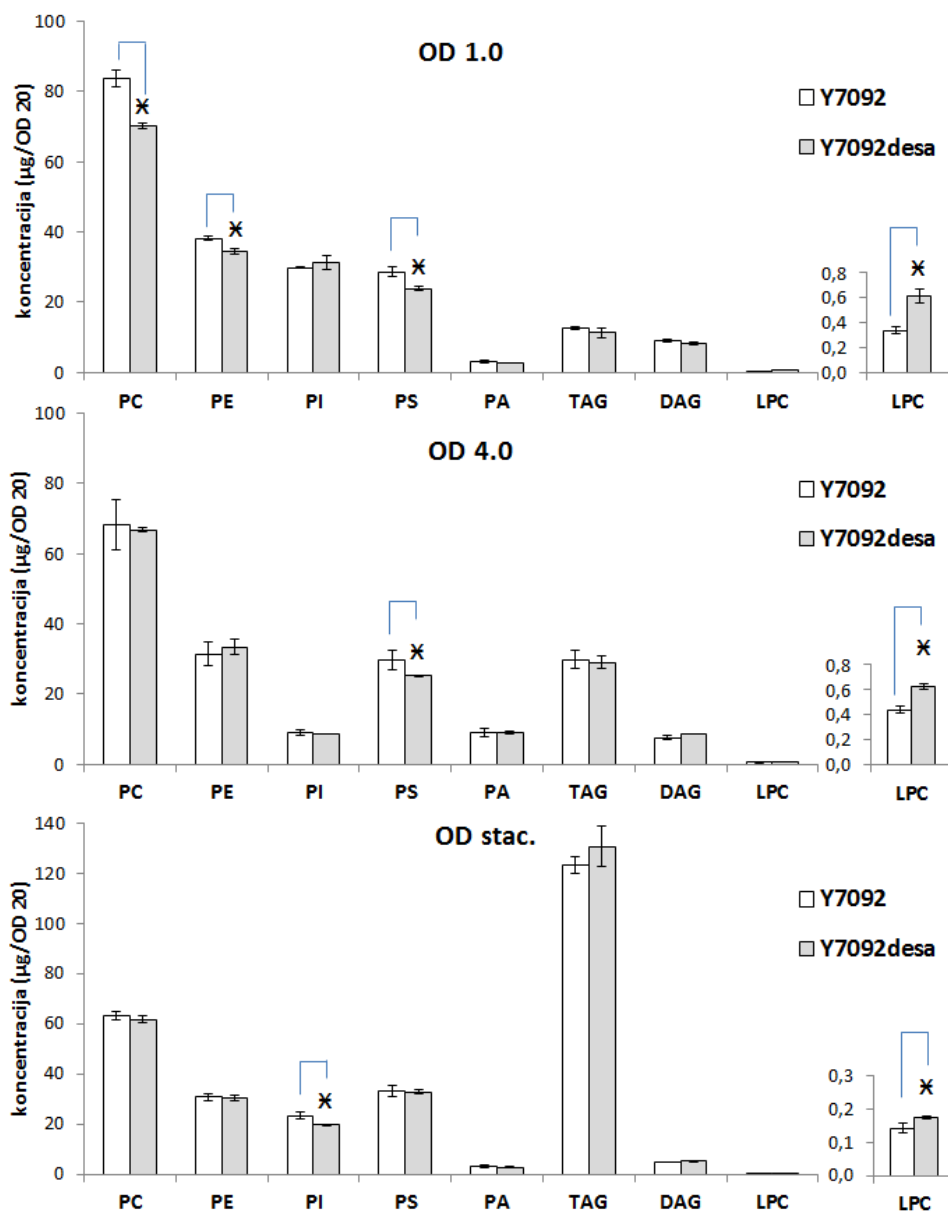


Slika 23. Ukupan sastav analiziranih lipidnih razreda sojeva Y7092 (gore) i Y7092desa (dolje) sakupljenih u ranoj logaritamskoj fazi (OD 1.0), srednjoj logaritamskoj fazi (OD 4.0) i stacionarnoj fazi (OD stac., 48 sati). Zbog niske koncentracije, razred LPC prikazan je na posebnom grafu.

U oba soja došlo je do značajnih promjena u ukupnim količinama pojedinih lipidnih razreda kao posljedice promjene faze rasta (slika 23). Primjetan je bio trend manjeg snižavanja ukupnih količina razreda PC i PE tijekom progresije kroz faze rasta. Razred LPC i DAG pokazali su značajno snižavanje ukupnih količina u stacionarnoj fazi u odnosu na prethodne dvije faze, u oba soja. Nadalje, u srednjoj logaritamskoj fazi došlo je do trostrukog snižavanja ukupnih količina PI, te njihovog ponovnog povećavanja u stacionarnoj fazi. Suprotno tome, u srednjoj logaritamskoj fazi došlo je do trostrukog povećanja ukupnih količina PA u odnosu na ostale dvije faze. Razred PS pokazali su trend manjeg porasta ukupnih količina u stacionarnoj fazi u odnosu na dvije prethodne faze. Međutim, najveće promjene tijekom napredovanja kroz faze rasta izmjerene su u razredu TAG, koji su pokazali trend eksponencijalnog povećanja ukupnih količina od rane logaritamske faze do stacionarne faze.

Unatoč sličnoj dinamici promjena ukupnih količina lipidnih razreda ovisno o fazi rasta, prisutnosti PUFA uzrokovala je manje, no statistički značajne, razlike u ukupnim količinama pojedinih lipidnih razreda u odnosu na kontrolni soj Y7092 (slika 24). U ranoj logaritamskoj fazi prisutnost PUFA uzrokovala je značajno snižavanje ukupnih količina razreda PC, PE i PS ($p < 0,05$), te povećanje ukupnih količina razreda LPC ($p < 0,05$). Prijelazom u srednju logaritamsku fazu, došlo je do izjednačavanja ukupnih količina svih lipidnih razreda u oba soja, osim razreda PS i LPC, koji su pokazali sličnu razliku izmjerenu u prethodnoj fazi rasta ($p < 0,05$). U stacionarnoj fazi, unatoč značajnom snižavanju ukupnih količina razreda LPC u oba soja, prisutnost PUFA je i dalje uzrokovala povećanje ukupnih količina u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Također, u stacionarnoj fazi došlo je do izjednačavanja ukupnih količina PS između sojeva, međutim došlo je do sniženje ukupnih količina PI ovisno o prisutnosti PUFA ($p < 0,05$).

Kako bi se detaljnije istražili putevi ugradnje PUFA u pojedinim lipidnim razredima, i promjene koje su se dešavale tijekom prilagodbe stanica na prisutnost PUFA, napravljena je analiza zastupljenosti lipinih vrsta s obzirom na prisutnost dvostrukih veza. Najzastupljenije lipidne vrste u glicerofosfolipidima kod kvasca su 32 i 34, te u manjem udjelu 36 lipidne vrste, koje nastaju različitim kombinacijama najzastupljenijih kvašćevih masnih kiselina: palmitinske (16:0), palmitoleinske (16:1), stearinske (18:0) i oleinske (18:1). Budući da jednostruko nezasićene masne kiseline čine do 80% u ukupnom udjelu masnih kiselina u aerobnim uvjetima u stanicama kvasca, najzastupljenije u oba soja bile su lipidne vrste s jednom dvostrukom vezom (kombinacija zasićene i jednostruko nezasićene masne kiseline), te s dvije dvostruke veze (kombinacija dvije jednostruko nezasićene masne kiseline). Međutim, djelovanjem $\Delta 12$ desaturaze došlo je do proizvodnje lipidnih vrsta koje u svom sastavu imaju PUFA. Unatoč velikoj razlici u zastupljenosti PUFA među lipidnim razredima (slika 33), u prosjeku, najzastupljenije vrste koje sadrže PUFA bile su 34:3 (kombinacija palmitoleinske i linolne kiseline), te u manjem udjelu 32:3 (kombinacija palmitoleinske i heksadekadinske kiseline). Ovaj rezultat bio je u korelaciji s udjelima linolne i heksadienske masne kiseline u ukupnom sastavu masnih kiselina u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom. Također, u pojedinim lipidnim razredima izmjerena je manja količina vrste 36:3 (kombinacija oleinske i linolne kiseline), dok su vrste s dvije dvostruko nezasićene masne kiseline bile u vrlo niskim koncentracijama u svim lipinim razredima.



Slika 24. Usporedba ukupnog sastava pojedinih lipidnih razreda između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta (vremena) u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom.

U soju Y7092desa, u ranoj logaritamskoj fazi, unutar razreda PC, proizvodnja vrsta s tri dvostruke veze, uzrokovala je dvostruko snižavanje vrsta s dvije dvostruke veze, te u manjem djelu snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom (slika 25). Unatoč visokom udjelu vrsta koje sadrže PUFA (~30%), u ovoj fazi, njihove ukupne količine nisu bile dovoljne da kompenziraju pad lipidnih vrsta s jednom i dvije dvostruke veze, što je za posljedice imalo sniženje ukupnih količina PC za 15% ($p < 0,05$). Zanimljivo, pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu, u kontrolnom soju, došlo je do snižavanja vrsta s dvije dvostruke

veze za jednu polovinu i dvostrukog povećanja vrsta s jednom dvostrukom vezom. Ovakav trend bio je zamjetan i u prisutnosti PUFA, s time da je pad stupnja nezasićenosti u soju Y7092desa prvenstveno bio kompenziran snižavanjem lipidnih vrsta s tri dvostruke veze za jednu polovinu; lipidne vrste s dvije dvostruke veze zadržale su sličnu količinu kao i u prethodnoj fazi. Posljedično tome i udio vrsta koje sadrže PUFA snižen je na 18%. U srednjoj logaritamskoj fazi došlo je do izjednačavanja ukupnih količina PC između dva soja, prvenstveno kao posljedica snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze u kontrolnom soju. U srednjoj logaritamskoj fazi, proizvodnja vrsta koje imaju PUFA u svom sastavu, kompenzirana je podjednako snižavanjem vrsta s jednom i dvije dvostruke veze. Sličan trend zadržan je i u stacionarnoj fazi, s time da je zabilježeno dodatno snižavanja udjela vrsta koje sadrže PUFA na 13%.

Za razliku od PC, unutar razreda PE zabilježene su puno manje promijene u lipidnim vrstama ovisno o fazi rasta, u obadva soja (slika 26). U ranoj logaritamskoj fazi, vrste koje sadržavaju PUFA (udio 18%) uzrokovale su snižavanje vrsta s dvije dvostruke veze, što je posljedično rezultiralo i nižim ukupnim količinama razreda PE za 10% ($p < 0,05$). U srednjoj logaritamskoj fazi, u soju Y7092, došlo je do snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze, te posljedično tome izjednačavanju ukupnih količina PE između dva soja. Unutar razreda PE, u sve tri faze rasta, proizvodnja vrsta sa tri dvostruke veze bila je isključivo kompenzirana snižavanjem vrsta s dvije dvostruke veze, s time da su količine (i udjeli) vrsta koje sadrže PUFA bile gotovo nepromijenjene u sve tri faze rasta.

Oba soja, u prve dvije faze rasta, zadržala su gotovo identične količine lipidnih vrsta unutar razreda PS (slika 27), s time da je prisutnost PUFA uzrokovala snižavanje ukupnih količina PS za oko 15% u obje faze rasta ($p < 0,05$). Ovakav pad ukupnih količina prvenstveno je bio posljedica sniženih količina vrsta s dvije dvostruke veze i manjim djelom vrsta s jednom dvostrukom vezom. Unutar razreda PS, udio vrsta koje sadrže PUFA, u prve dvije faze rasta bio je niži u odnosu na razrede PC i PE (8 - 10%). Zanimljivo, u kontrolnom soju u stacionarnoj fazi došlo je do povećanja proizvodnje vrsta s jednom dvostrukom vezom (za više od dva puta), te snižavanja količina vrsta s dvije dvostruke veze. Ovakav trend također je zabilježen i u prisutnosti PUFA, s time da je u soju Y7092desa pad nezasićenosti prvenstveno bio reguliran smanjenom proizvodnjom vrsta s tri dvostruke veze (udio je snižen na 2%), dok su vrste s dvije dvostruke veze zadržale slične količine kao i u prethodnim fazama. Kao posljedica sniženog udjela vrsta koje imaju PUFA u svom sastavu, u stacionarnoj fazi došlo je

do izjednačavanja ostalih vrsta između sojeva, što je rezultiralo i izjednačavanjem ukupnih količina PS.

Unutar razreda PI, prisutnost PUFA uzrokovala je značajne promjene u udjelima lipidnih vrsta, iako su ukupne količine bile nepromijenjene između dva soja u prve dvije faze rasta (slika 28). PUFA su uzrokovale povećanje lipidnih vrsta s dvije dvostruke veze te kompenzacijsko snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom u sve tri faze rasta. Zanimljivo, do ovakvih promjena došlo je unatoč vrlo niskom udjelu vrsta PI koje sadrže PUFA (ispod 5%; najniži udio od svih lipidnih razreda). Kada se gledaju promjene ovisno o fazi rasta, u srednjoj logaritamskoj fazi došlo je do snižavanja ukupnih količina PI za gotovo 70%, u obadva soja. U stacionarnoj fazi ponovno je došlo do povećanja ukupnih količina, s time da je kontrolni soj imao više ukupnih PI za 15% u odnosu na soj Y7092desa ($p < 0,05$). Međutim, unatoč značajnim varijacijama ukupnih količina PI, ovisno o fazi rasta, udjeli pojedinih lipidnih vrsta ostali su gotovo nepromijenjeni u oba soja; zabilježene promjene odnose se na snižavanje udjela vrsta s dvije dvostruke veze u srednjoj logaritamskoj fazi (u soju Y7092desa došlo je također i do snižavanja udjela vrsta s tri dvostruke veze sa 4,5% na 1,5%), te povećanje udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom u stacionarnoj fazi.

Unutar razreda DAG, u sve tri faze rasta, prisutnost PUFA nije utjecala na statistički značajne razlike ukupnih količina u odnosu na kontrolni soj (slika 29). U ranoj logaritamskoj fazi, kao kompenzacija proizvodnji vrsta koje sadrže PUFA došlo je do podjednagog snižavanja vrsta s jednom i dvije dvostruke veze; vrste s tri dvostruke veze sačinjavale su 30% udjela svih DAG vrsta. Prilikom prijelaza u srednju logaritamsku fazu, u kontrolnom soju došlo je do snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze za gotovo jednu polovinu, te manjeg povećanja vrsta s jednom dvostrukom vezom, što je dovelo do snižavanja ukupnih količina DAG u odnosu na prethodnu fazu za 15% ($p < 0,05$). Ovakav trend smanjenja stupnja nezasićenosti bio je zamjetan i u prisutnosti PUFA, s time da je u soju Y7092desa on bio prvenstveno reguliran snižavanjem vrsta s tri dvostruke veze za jednu trećinu, čime je njihov udio pao na 20%; lipidne vrste s dvije dvostruke veze zadržale su slične količine kao i u prethodnoj fazi. U soju Y7092desa, u srednjoj logaritamskoj fazi, nije došlo do snižavanja ukupnih količina DAG u odnosu na prethodnu fazu, što je rezultiralo povećanjem ukupnih količina DAG u odnosu na kontrolni soj za oko 10% (iako nije statistički značajno). U srednjoj logaritamskoj fazi proizvodnja lipidnih vrsta koje sadrže PUFA, isključivo je bila kompenzirana sniženom količinom vrsta s jednom dvostrukom vezom. U stacionarnoj fazi, u obadva soja, došlo je do snižavanja ukupnih količina DAG za oko 40%. Kada se uspoređuju

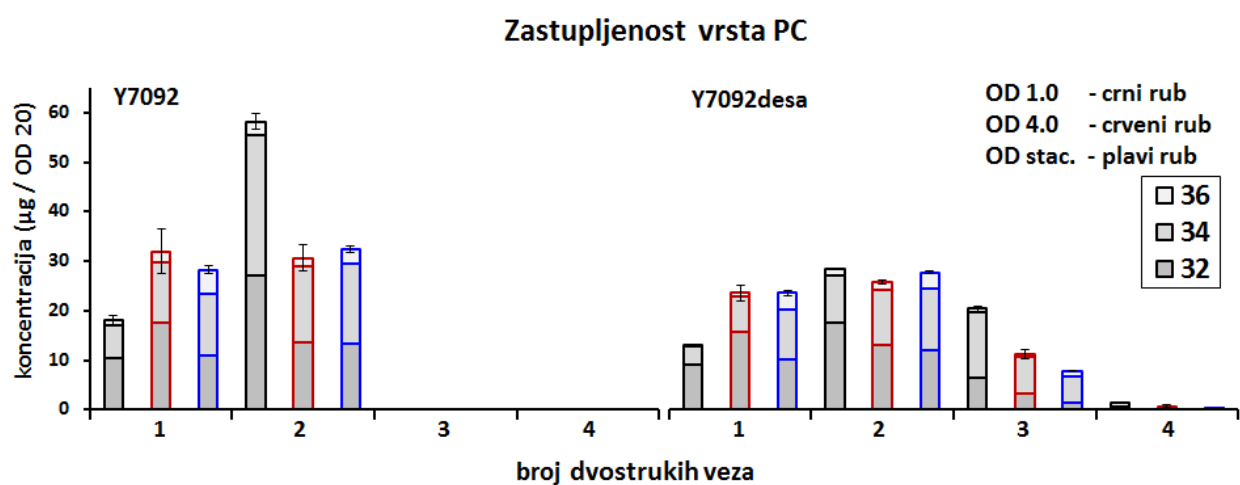
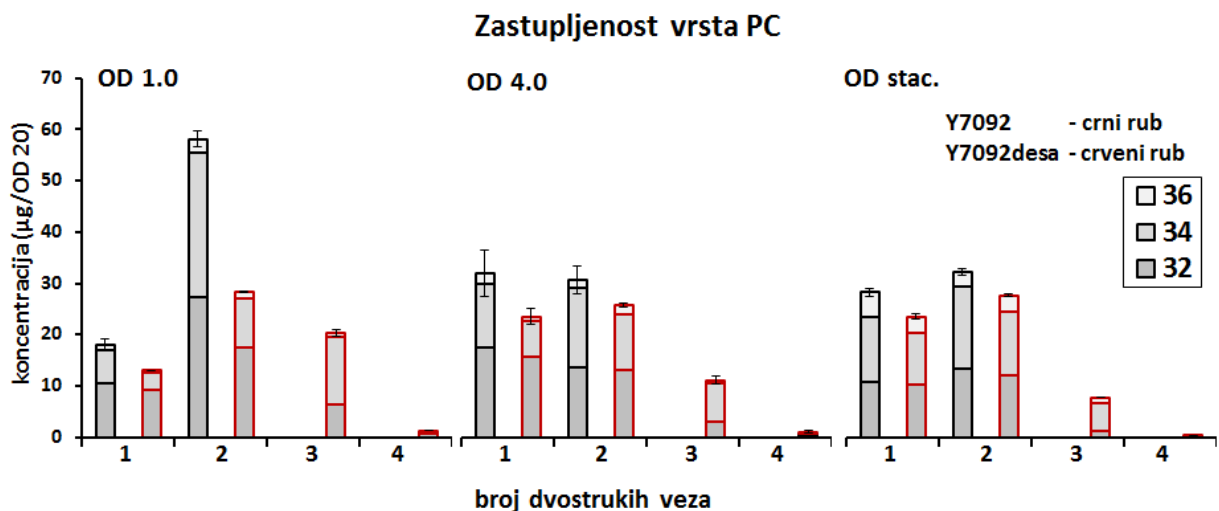
relativni udjeli, vidljivo je da je u stacionarnoj fazi, u obadva soja, došlo do povećanja stupnja nezasićenosti DAG vrsta u odnosu na prethodnu fazu (smanjeni udio vrsta s jednom dvostrukom vezom i povećani udio vrsta s dvije dvostruke veze). Soj Y7092desa zadržao je udjele vrsta koje sadrže PUFA na razini iz prethodne faze (20%), koje su također, kao i u prethodnoj fazi, bile kompenzirane sniženjem vrsta s jednom dvostrukom vezom. Zanimljivo, u srednjoj logaritamskoj i stacionarnoj fazi, sniženje vrsta s jednom dvostrukom vezom nije bilo dovoljno da kompenzira proizvodnju vrsta s tri dvostruke veze, što je pridonjelo povećanju ukupnih količina DAG u soju Y7092desa za oko 10%, što međutim nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$).

Prisutnost PUFA nije uzrokovala statistički značajnu razliku u ukupnim količinama PA, u odnosu na kontrolni soj, u sve tri faze rasta (slika 30). U ranoj logaritamskoj fazi, vrste koje sadržavaju PUFA, sačinjavale su 11,5 % ukupnog udjela vrsta PA, a kao kompenzacija došlo je do snižene proizvodnje vrsta s jednom dvostrukom vezom. Prilikom prelaska u srednju logaritamsku fazu, u obadva soja došlo je do trostrukog povećanja ukupnih količina PA, međutim svaki soj zadržao je slične relativne udjele lipidnih vrsta kao i u prethodnoj fazi; primjetan je bio manji porast udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom i kompenzacijskog snižavanja udjela vrsta s dvije dvostruke veze. U stacionarnoj fazi došlo je ponovno do snižavanja ukupnih količina na sličnu razinu sličnu kao i u prvoj fazi; u oba soja nastavljen je trend manjeg povećanja relativnih udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom i snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze iz prethodne faze. U soju Y7092desa, pad stupnja nezasićenosti prvenstveno je bio reguliran smanjenjem udjela vrsta s tri dvostruke veze za gotovo jednu polovinu, u odnosu na prethodne dvije faze (6% udjela). Kao i u prethodnim fazama, proizvodnja vrsta PA s tri dvostruke veze prvenstveno je bila kompenzirana sniženom proizvodnjom vrsta s jednom dvostrukom vezom.

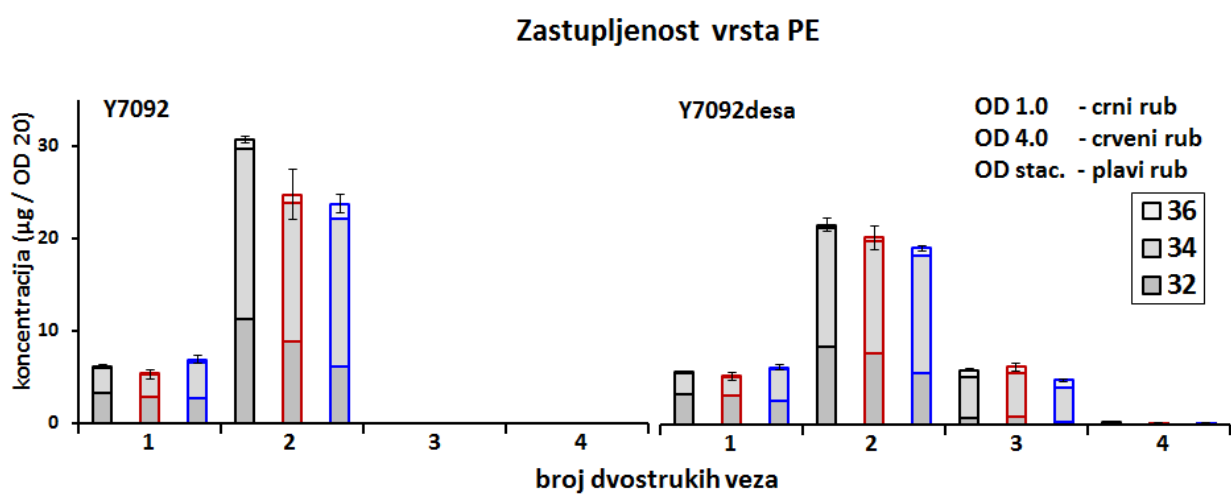
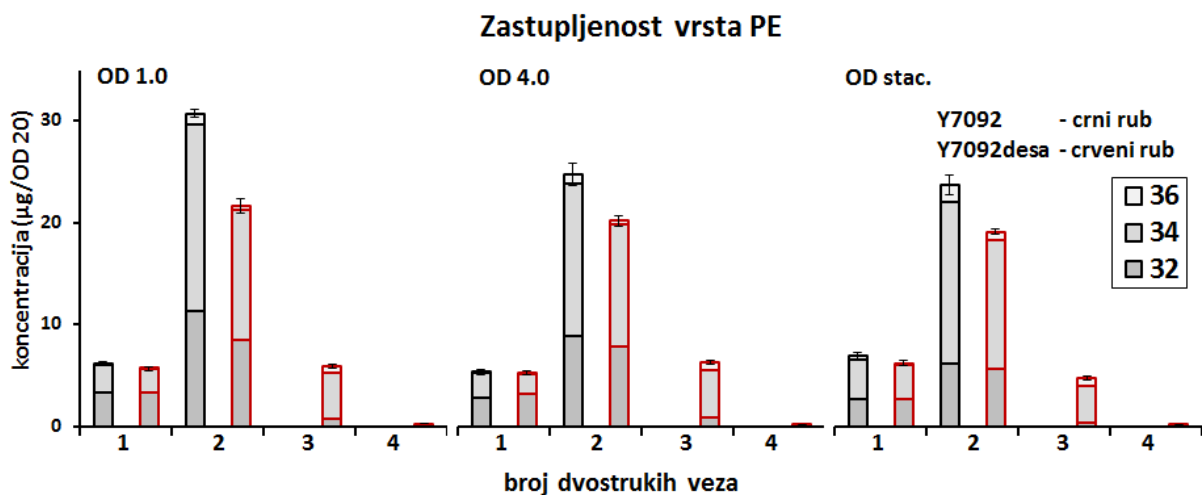
U soju Y7092desa zabilježen je porast ukupnih količina LPC u sve tri faze rasta ($p < 0,05$), iako je tijekom progresije kroz faze rasta došlo do smanjenja razlike u odnosu na kontrolni soj: 80% u ranoj logaritamskoj fazi, 40% u srednjoj logaritamskoj i 20% u stacionarnoj fazi (slika 31). U ranoj logaritamskoj fazi, PUFA su uzrokovale povećanje svih LPC vrsta (osim 18:1), u odnosu na kontrolu, s time da je udio vrsta koje sadrže PUFA u svom sastavu bio 30% (slično kao i u razredu PC). Smanjenje razlike ukupnih količina LPC između sojeva, tijekom kasnijih faza rasta, popraćeno je također i smanjenjem udjela vrsta koje sadržavaju PUFA u svom sastavu (19% u srednjoj logaritamskoj i 10% u stacionarnoj fazi); dobra korelacija sa sličnim smanjenjem udjela vrsta koje sadrže PUFA u razredu PC.

Ovaj rezultat pokazao je da povećani udio PUFA unutar razreda PC direktno utječe na povećanu potrebu stanice za remodeliranjem ovog lipidnog razreda (i obrnuto).

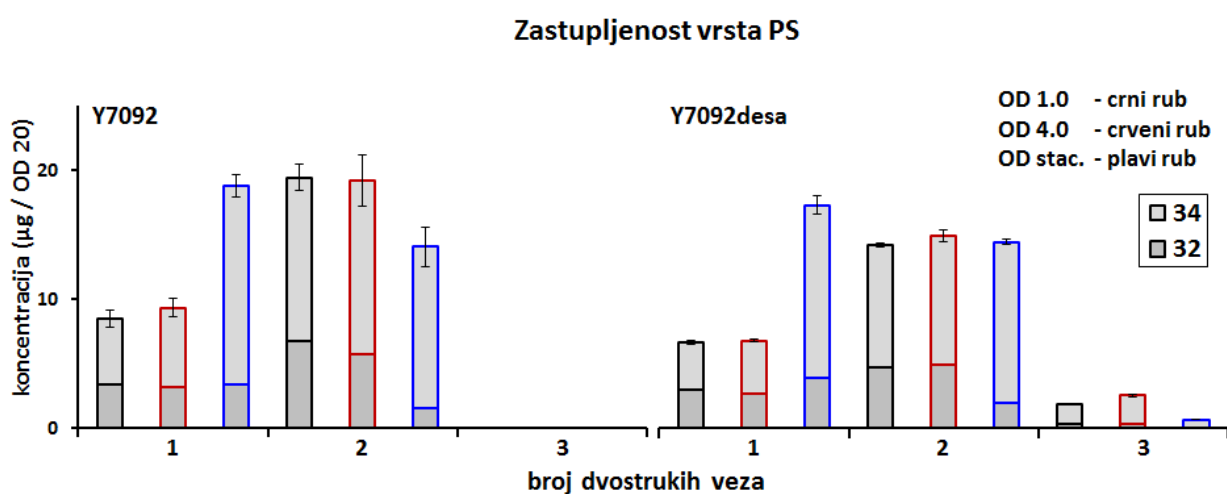
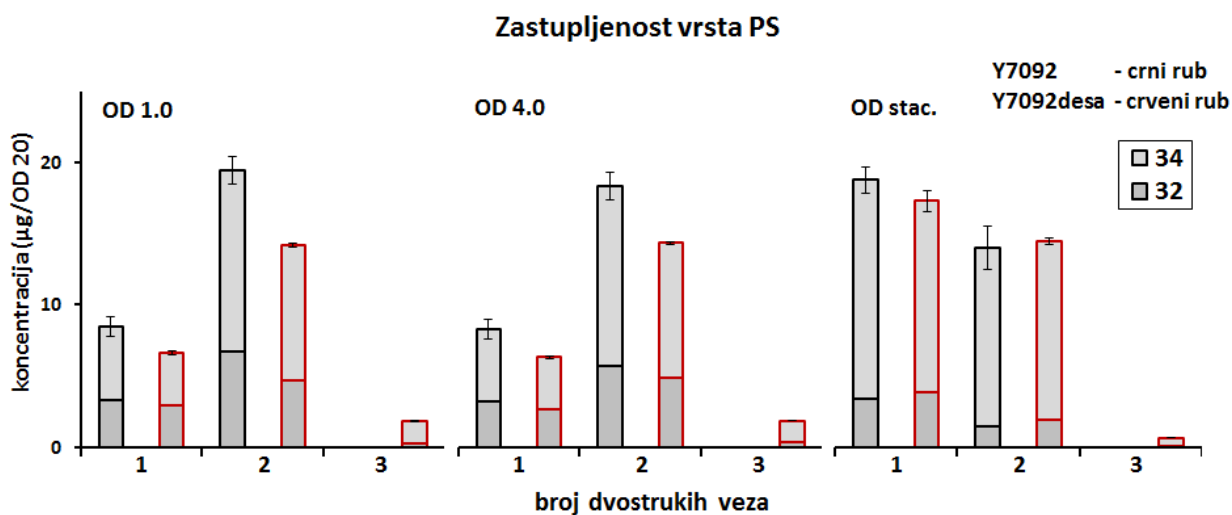
U skladu s literaturnim podacima, tijekom progresije kroz faze rasta, u oba soja došlo je do eksponencijalnog povećanja ukupnih količina TAG [179-181], s time da PUFA nisu uzrokovale statistički značajne razlike u ukupnim količinama u odnosu na kontrolni soj (slika 32). U ranoj eksponencijalnoj fazi, u soju Y7092desa, došlo je do snižavanja količina vrsta s jednom i dvije dvostruke veze, te proizvodnje vrsta sa četiri i pet dvostrukih veza, koje su sačinjavale 11% ukupnog udjela TAG. Međutim, također je bila moguća ugradnja PUFA u vrste koje sadrže tri ili dvije dvostruke veze, ali zbog ograničenja metode nije bila moguća detaljnija analiza sastava masnih kiselina pojedinih vrsta. U daljnjem tekstu koristit će se samo vrste s četiri ili više dvostrukih veza u kontekstu vrsta koje sadrže PUFA. Kada se analiziraju relativni udjeli, pri prijelazu u srednju eksponencijalnu fazu, u kontrolnom soju, došlo je do velikog porasta vrsta jednom dvostrukom vezom te kompenzacijskog smanjenja udjela vrsta s tri dvostruke veze. Sličan trend zabilježen je i u prisutnosti PUFA, s time da je došlo do puno manjeg pada udjela vrsta s tri dvostruke veze i komplementarno manjeg porasta udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom. Posljedično tome, u soju Y7092desa, ukupne količine vrsta s jednom i dvije dvostruke veze bile su snižene u odnosu na kontrolu (kao i u prethodnoj fazi), međutim došlo je do povećanja količina vrsta s tri dvostruke veze. Udjeli vrsta koje sadrže PUFA pokazali su manji pad u odnosu na prethodnu fazu (8%). U kontrolnom soju, u stacionarnoj fazi, ukupni udjeli vrsta ovisno o broju dvostrukih veza bili su gotovo identični kao i u ranoj logaritamskoj fazi (unatoč deset puta većoj ukupnoj količini i određenim razlikama u udjelima pojedinačnih vrsta). Sličan trend zabilježen je i u soju Y7092desa, uz povećanje udjela vrsta s dvije dvostruke veze. Međutim, kada se uspoređuju količine, za razliku od rane logaritamske faze, u stacionarnoj fazi došlo je gotovo do izjednačavanja vrsta s dvije dvostruke veze između dva soja, a također se smanjila razlika u vrstama s jednom dvostrukom vezom. Vrste s tri dvostruke veze zadržale su povećanu količinu iz prethodne faze u soju Y7092desa. Udio vrsta koje sadrže PUFA ostao je na razini iz prethodne faze (8%), unatoč padu udjela vrsta s pet dvostrukih veza.



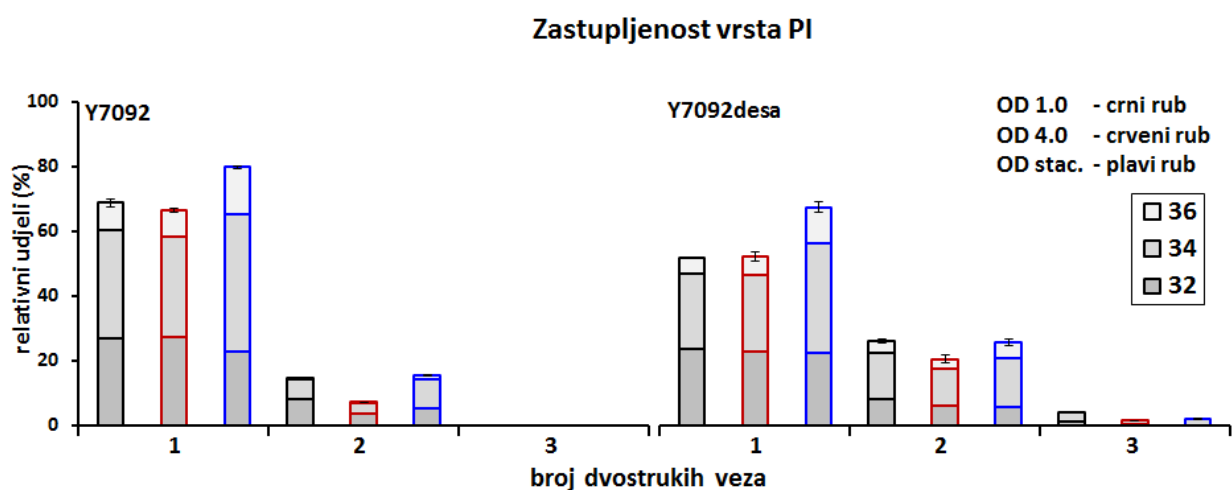
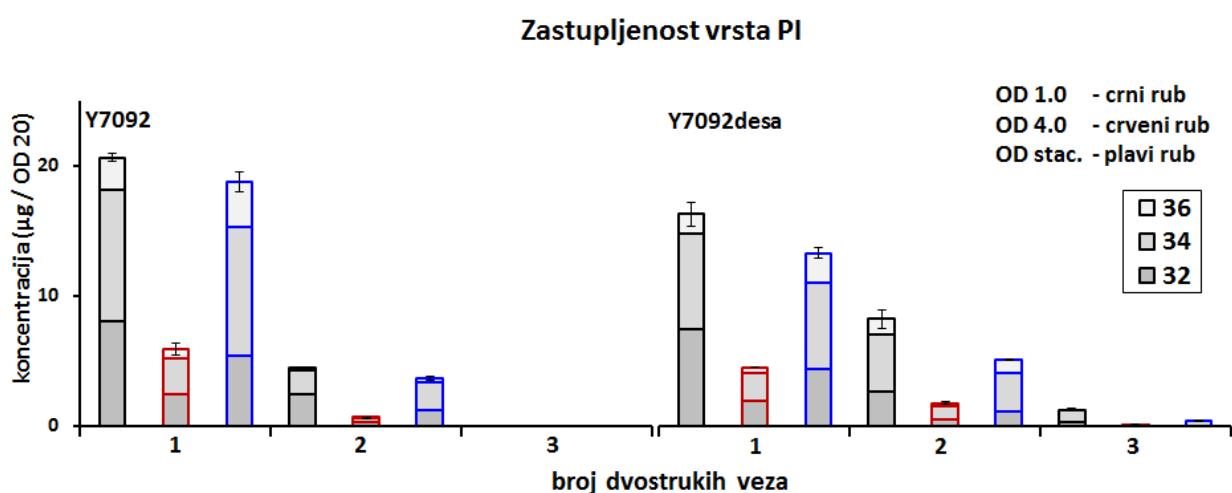
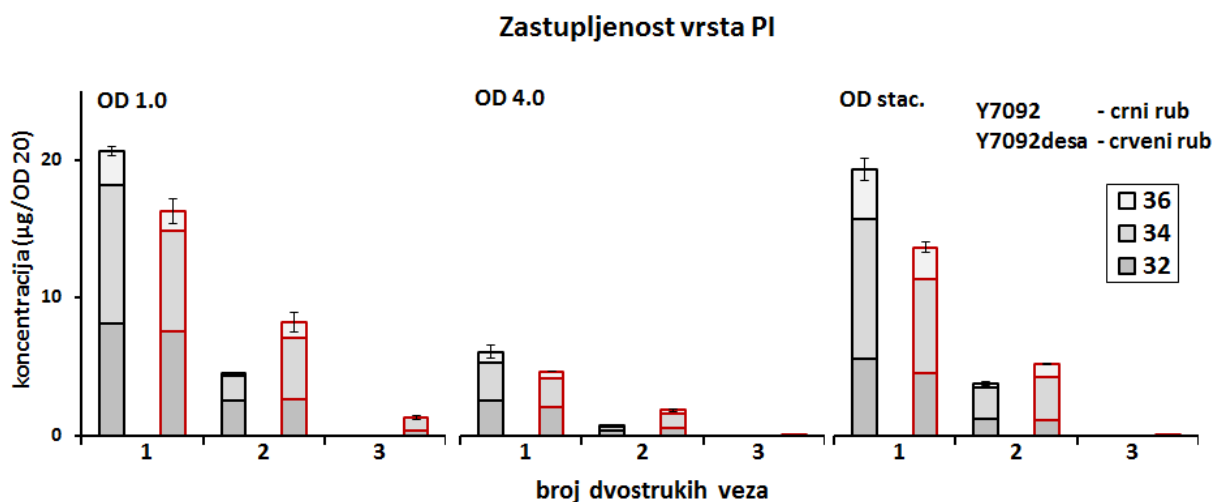
Slika 25. Usporedba najzastupljenijih vrsta PC ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena najzastupljenijih vrsta PC ovisno o broju dvostrukih veza u soju Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (dolje).



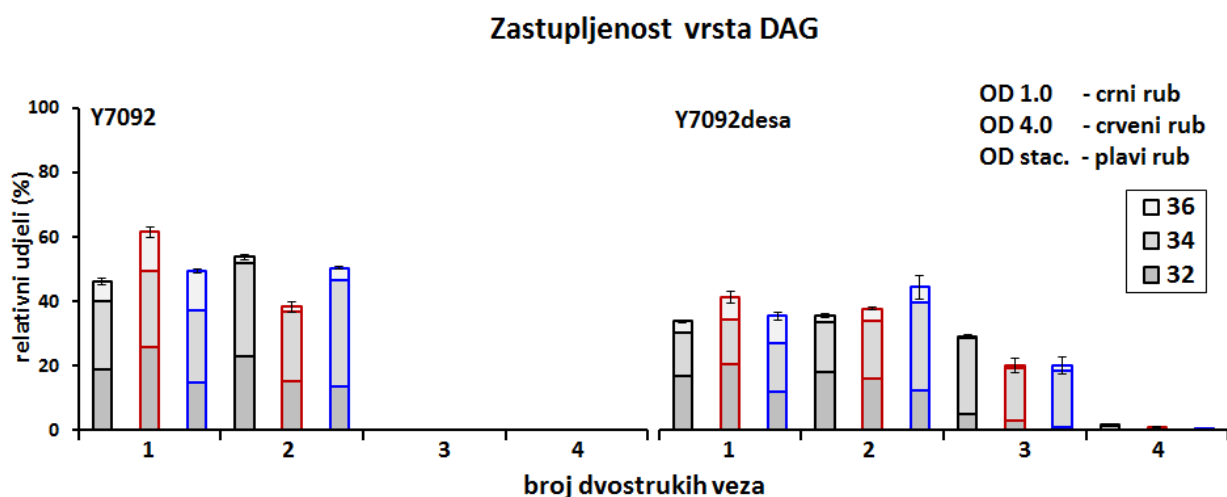
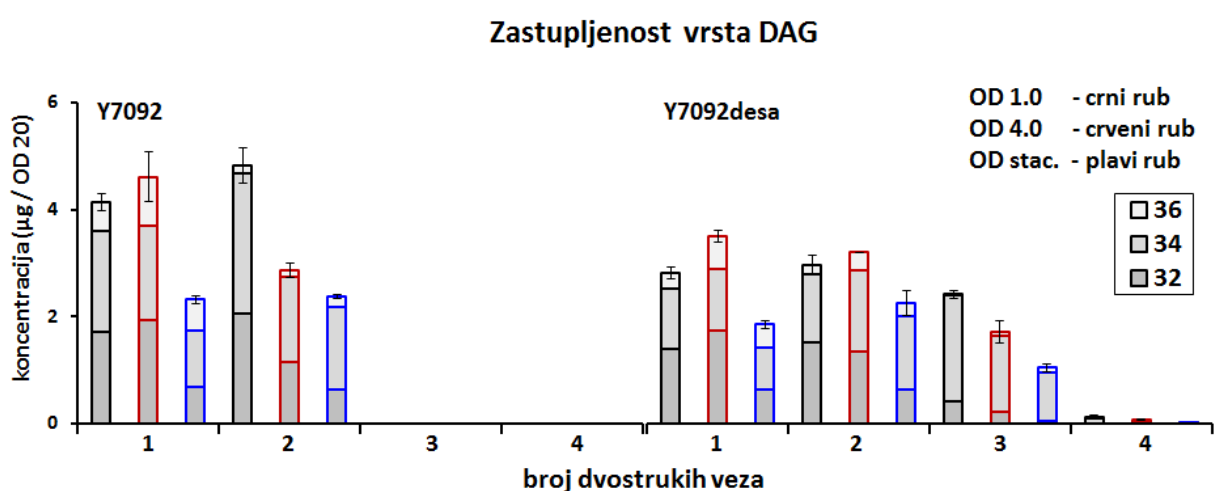
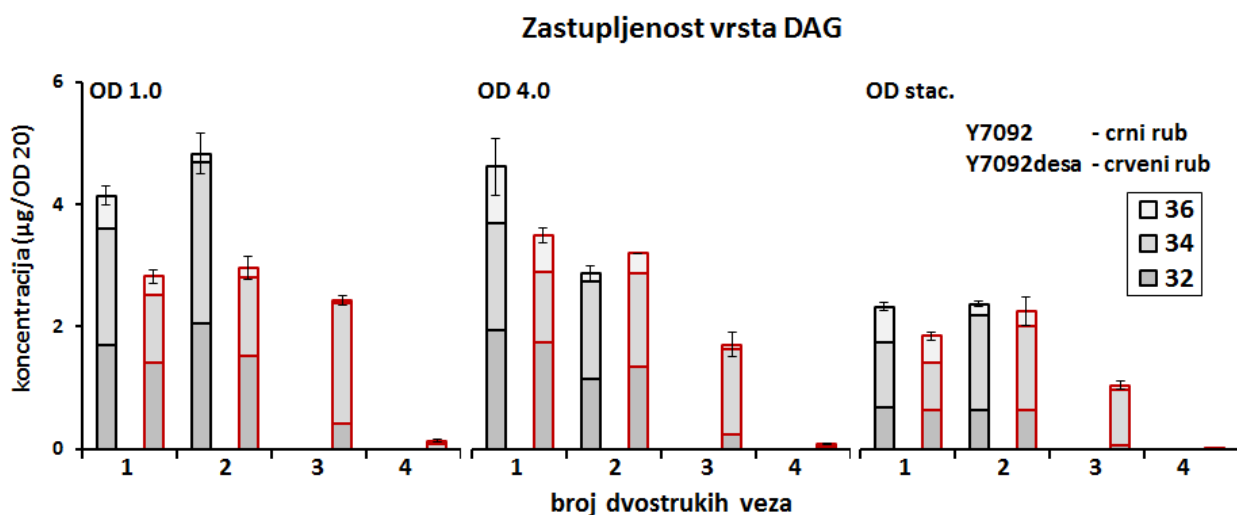
Slika 26. Usporedba najzastupljenijih vrsta PE ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena najzastupljenijih vrsta PE ovisno o broju dvostrukih veza u soju Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (dolje).



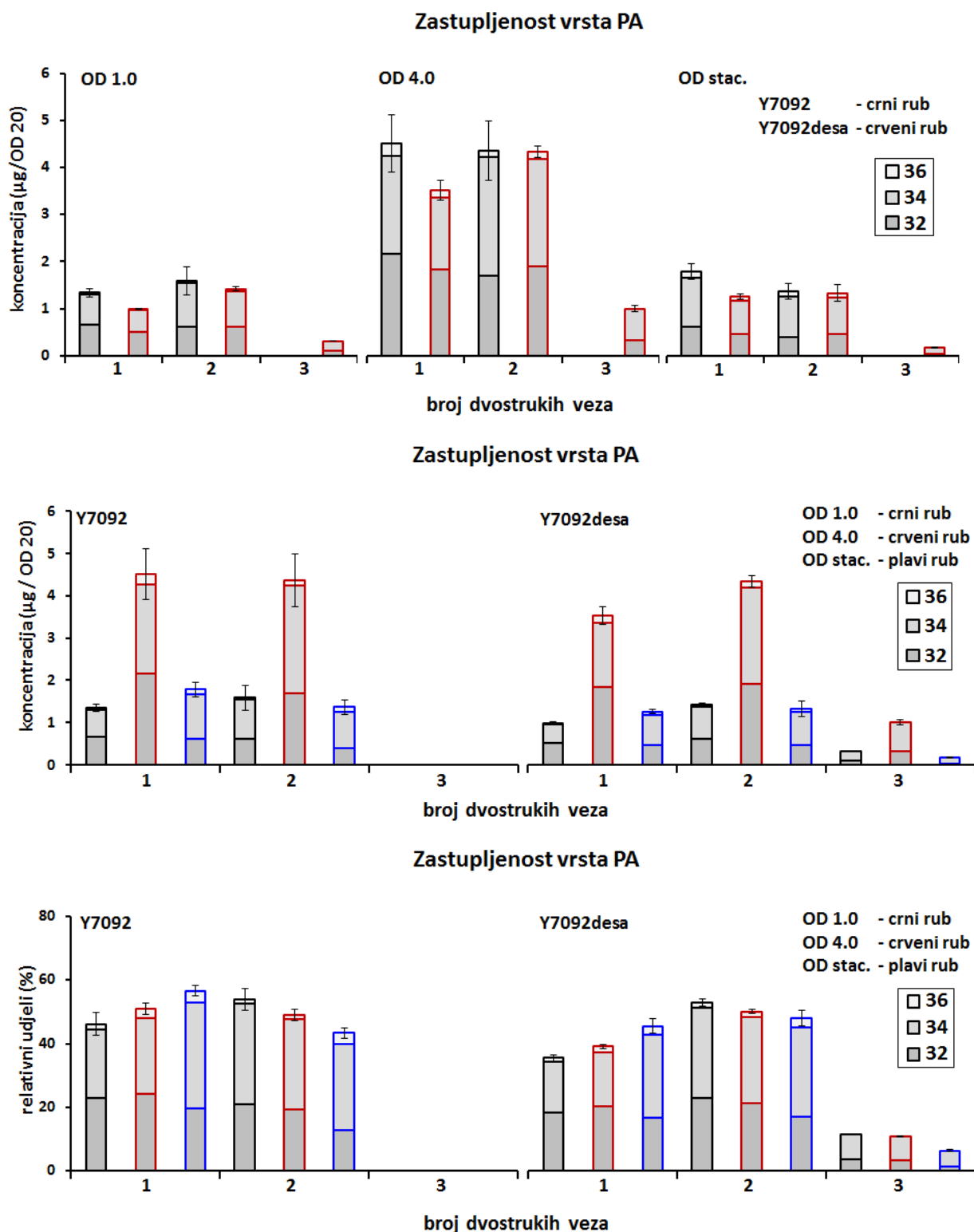
Slika 27. Usporedba najzastupljenijih vrsta PS ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena najzastupljenijih vrsta PS ovisno o broju dvostrukih veza u soju Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (dolje).



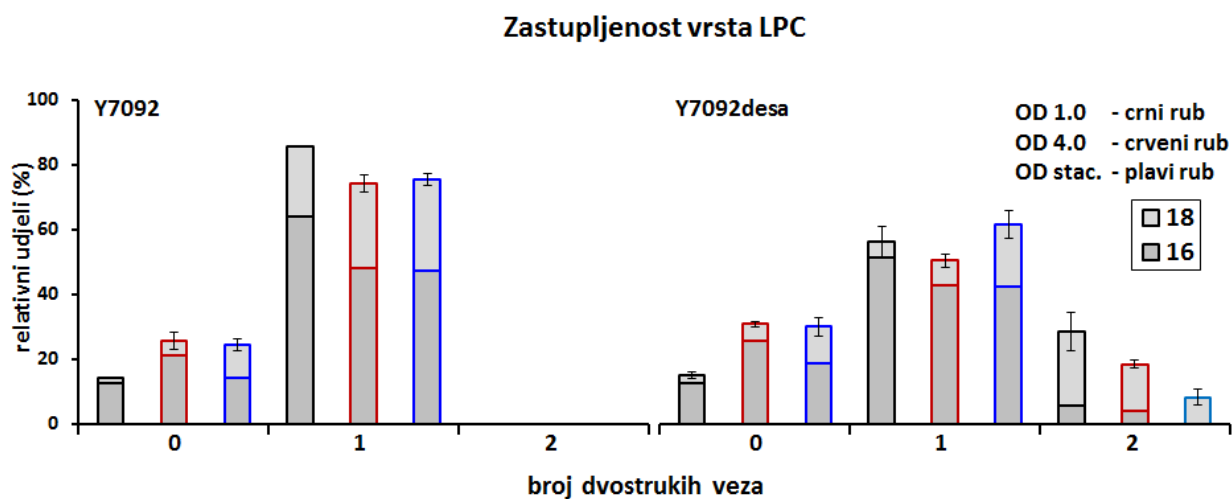
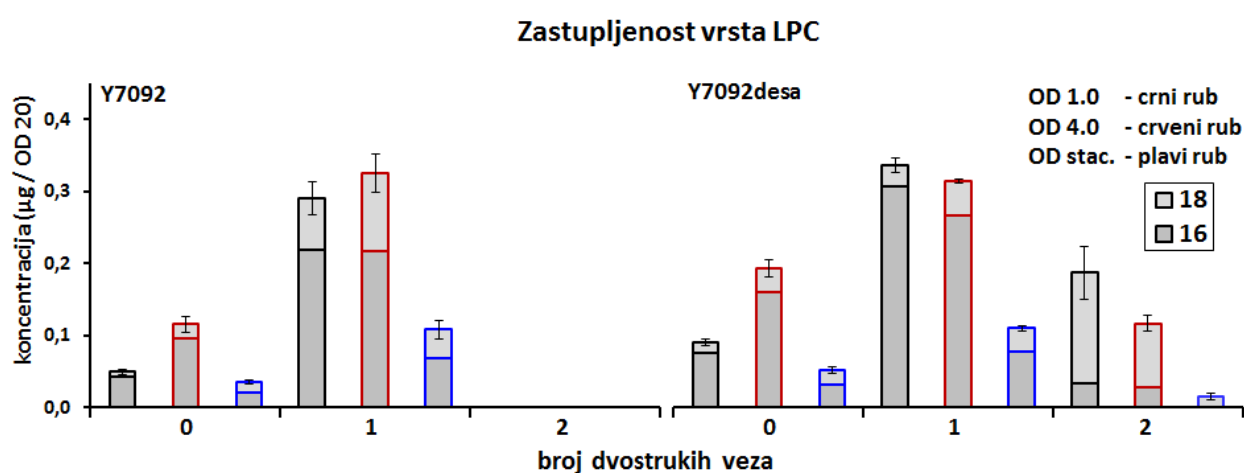
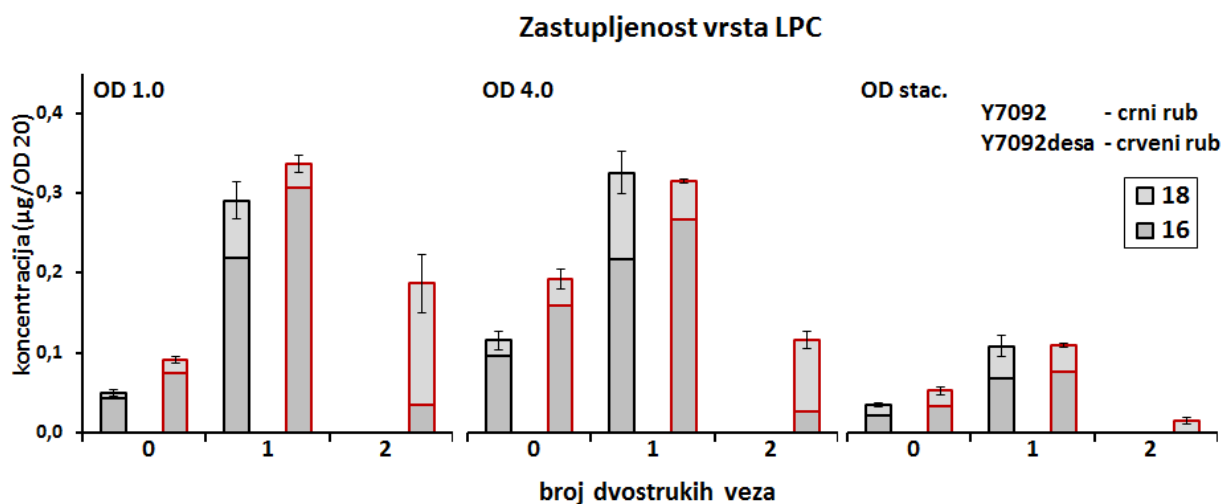
Slika 28. Usporedba najzastupljenijih vrsta PI ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta PI ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).



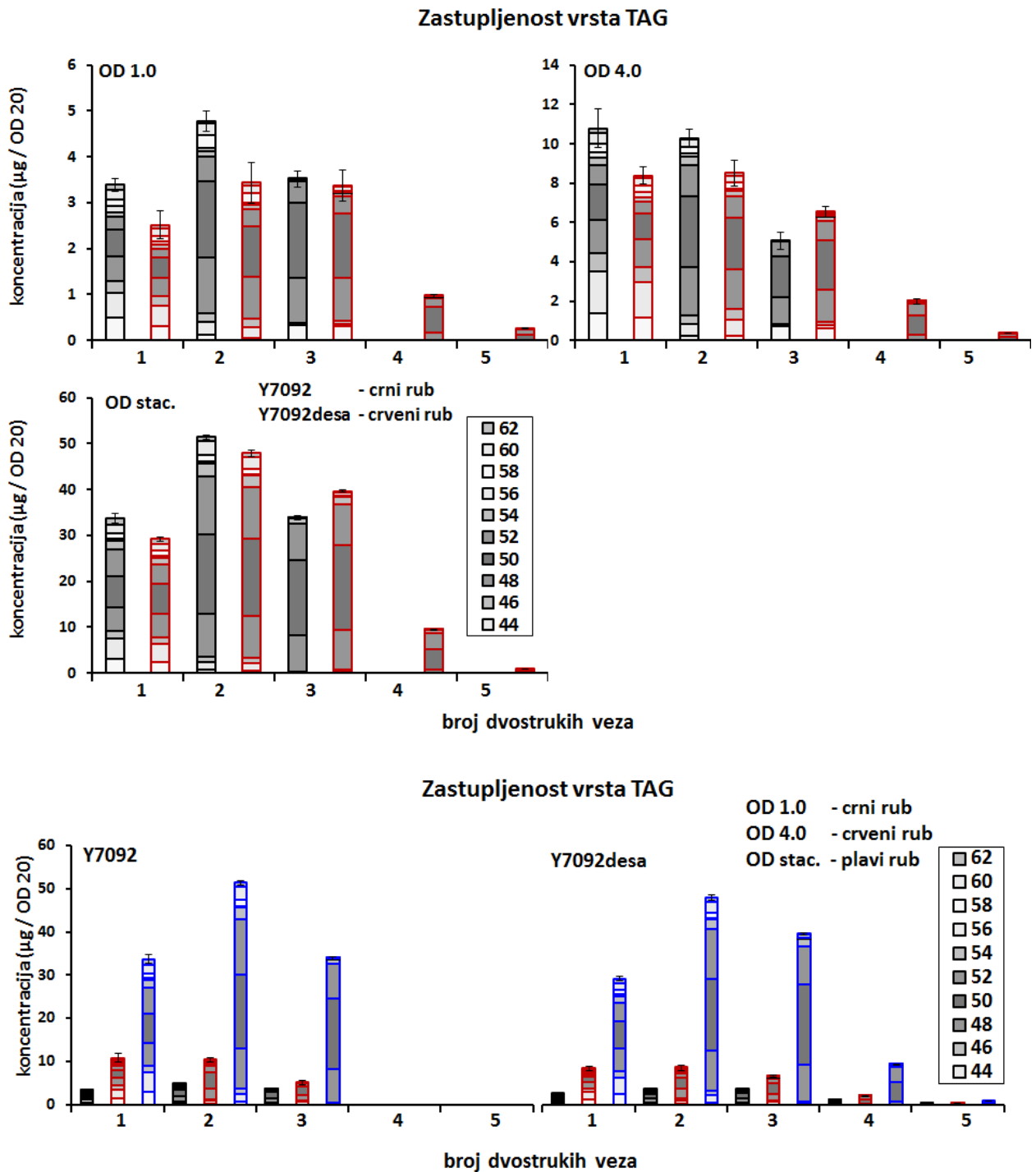
Slika 29. Usporedba najzastupljenijih vrsta DAG ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta DAG ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).



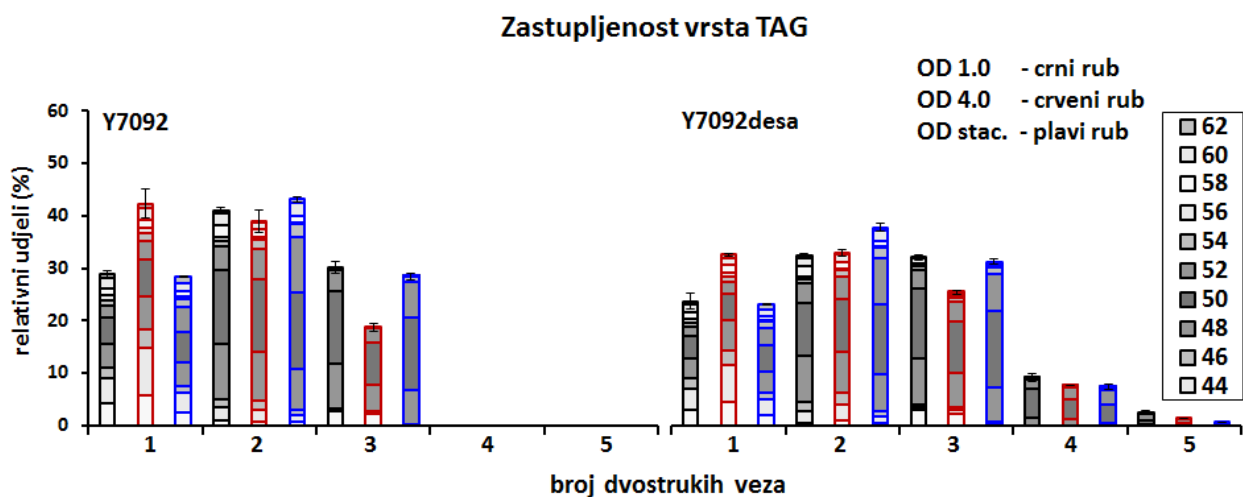
Slika 30. Usporedba najzastupljenijih vrsta PA ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta PA ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).



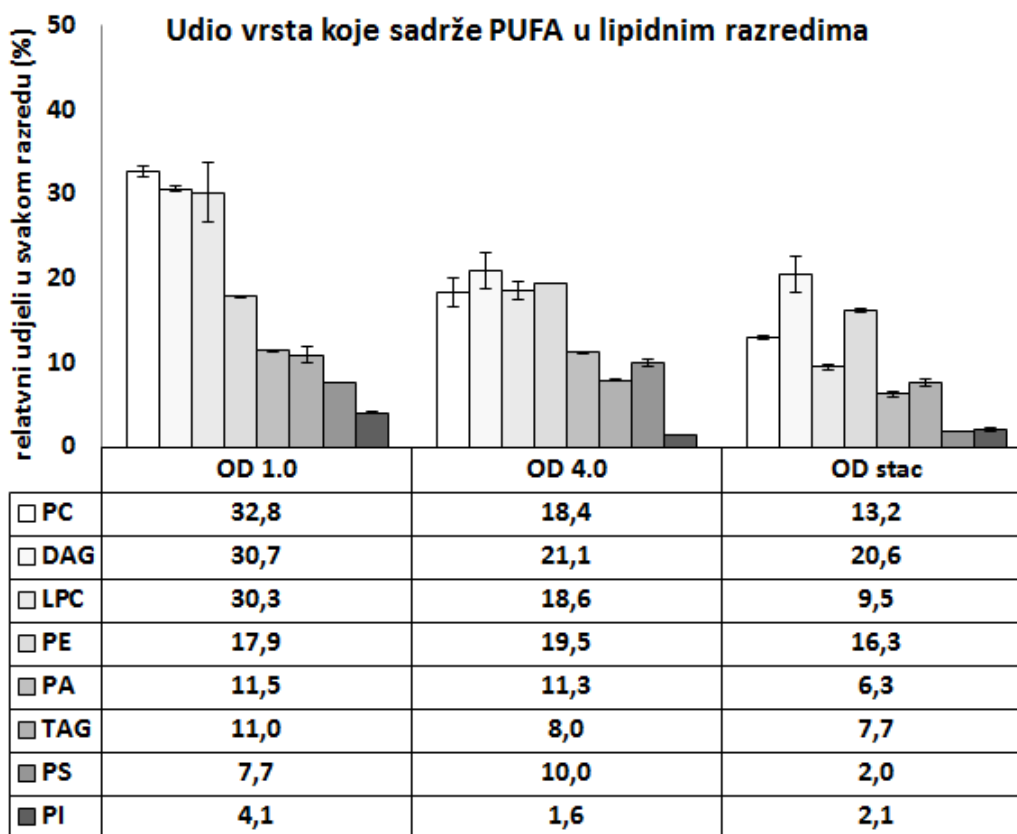
Slika 31. Usporedba najzastupljenijih vrsta LPC ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta LPC ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).



Slika 32. Usporedba najzastupljenijih vrsta TAG ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta TAG ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (iduća strana).



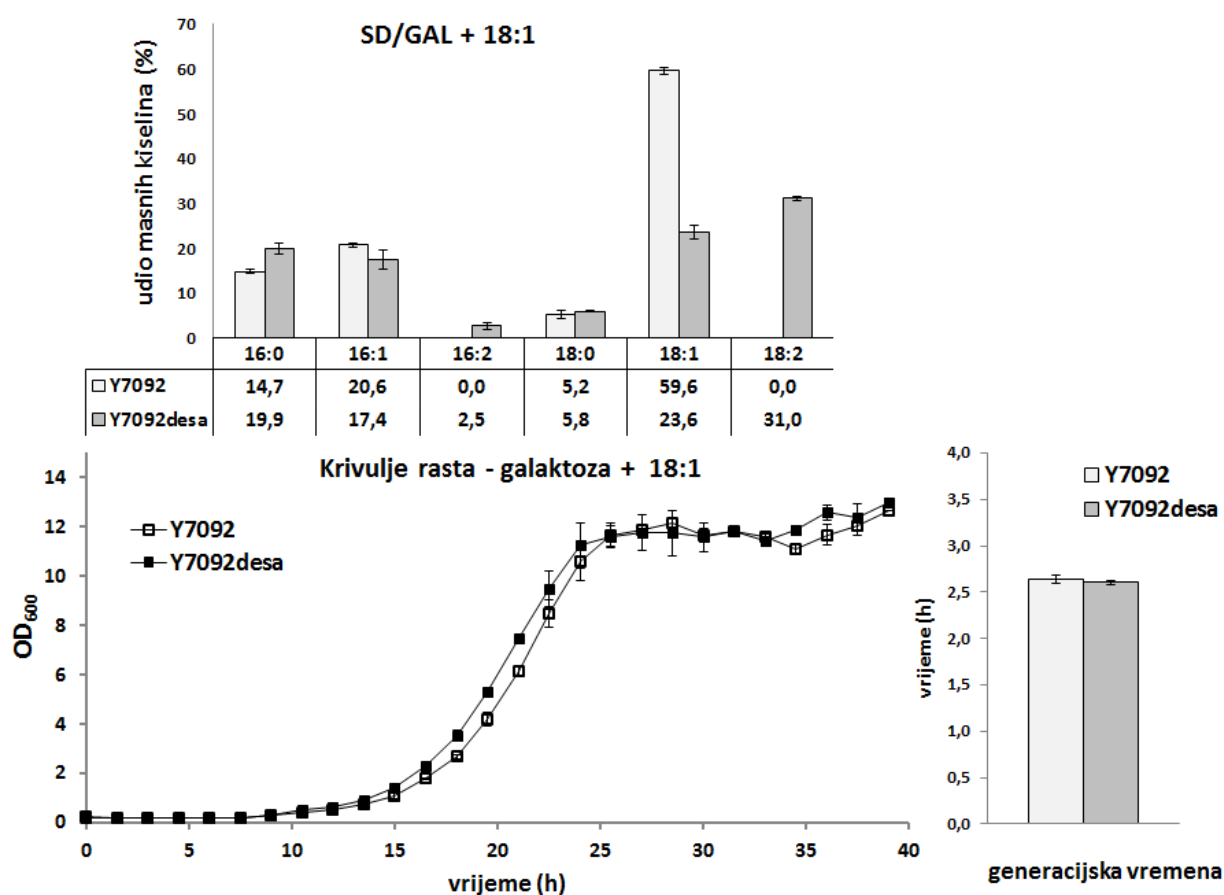
Slika 32. Nastavak.



Slika 33. Promjene u udjelima vrsta koje sadrže PUFA u analiziranim lipidnim razredima, ovisno o fazi rasta u mediju s galaktozom.

3.3.1. Suplementacija oleinskom kiselinom (18:1)

Kvasac lako unosi masne kiseline iz okolnog medija u stanicu, te ih ugrađuje u svoje lipide, a ovisno o vrsti suplementiranih masnih kiselina može doći do značajnih promjena u sastavu lipidnih vrsta [19]. Oleinska kiselina (18:1, ω -9) služi kao supstrat za Δ 12 desaturazu, pri čemu dolazi do sinteze linolne kiseline (18:2, -6) [11]. Kako bi se istražilo da li suplementacija medija oleinskom kiselinom uzrokuje povećanu sintezu linolne kiseline u soju Y7092desa, analiziran je sastav masnih kiselina stanica sakupljenih u logaritamskoj fazi rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom suplementiranim oleinskom kiselinom. Kao kontrola korišten je soj Y7092 (slika 35).

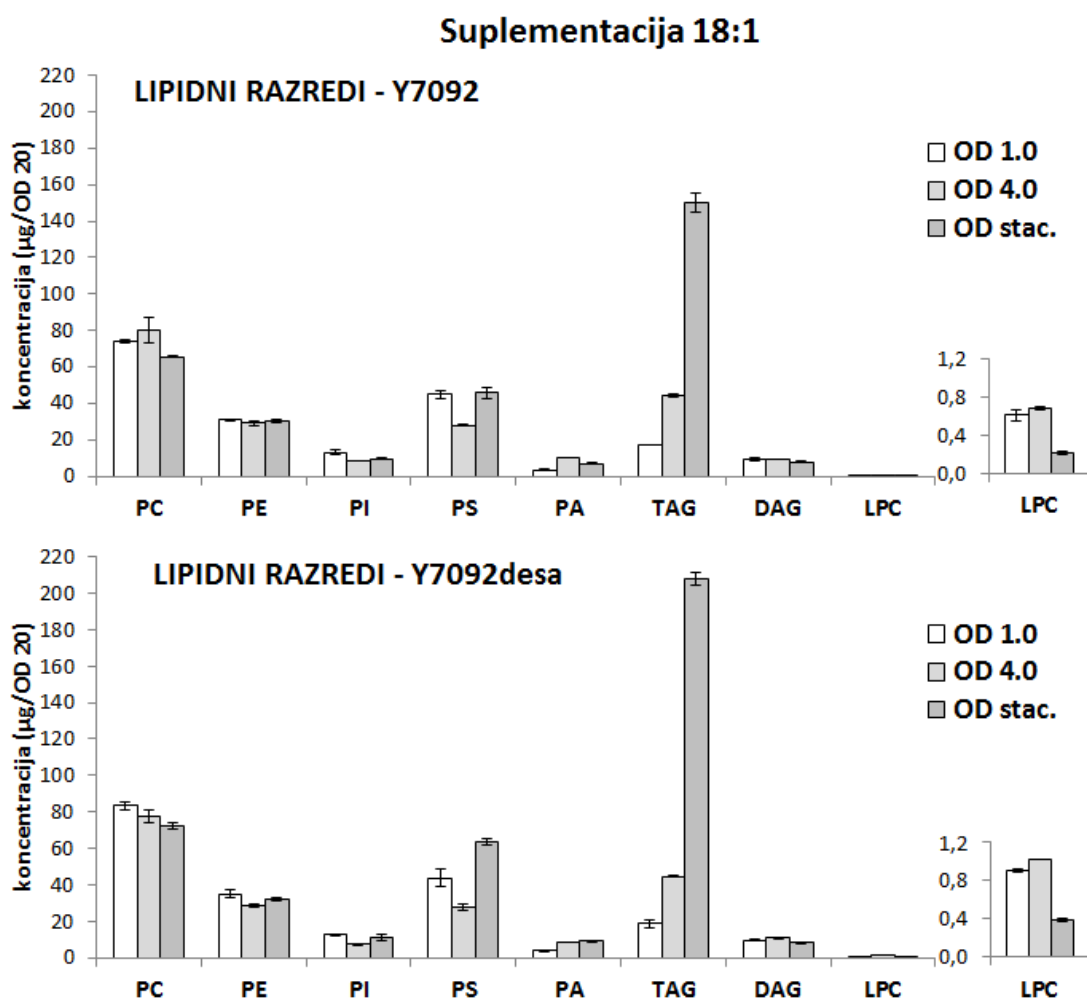


Slika 34. Prikazan je udio najzastupljenijih masnih kiselina u sojevima Y7092 i Y7092desa sakupljenim u logaritamskoj fazi rasta, u mediju s galaktozom suplementiranim oleinskom kiselinom (0,01%, w:v) (gore). Na donjem grafu, prikazana je krivulja rasta sojeva Y7092 i Y7092desa u istim uvjetima. Generacijska vremena stanica u logaritamskoj fazi rasta prikazana su na slici dolje desno.

Kao posljedica suplementacije, došlo je do značajnih promjena u sastavu masnih kiselina. Očekivano, došlo je do povećanja udjela suplementirane oleinske kiseline i smanjenja udjela palmitinske i palmitoleinske kiseline, u oba soja. Međutim, u soju

Y7092desa, također je došlo i do dvostrukog povećanja udjela linolne kiseline u odnosu na ne suplementirane stanice, a kao posljedica snižavanja udjela masnih kiselina sa 16 ugljikovih atoma, došlo je do smanjene proizvodnje heksadekadienske kiseline (16:2, ω -4). Međutim, povećani udio PUFA (linolne kiseline), u uvjetima suplementacije, nije uzrokovao razliku u rastu stanica u odnosu na soj Y7092 (slika 34).

Nadalje, kako bi se istražile promjene u sastavu pojedinih lipidnih razreda i lipidnih vrsta tijekom prilagodbe stanica kvasca na povećanje udjela PUFA (linolne kiseline), napravljena je kvantifikacija lipida u stanicama sakupljenim u tri različita vremena od početka indukcije gena za Δ 12 desaturazu u mediju s galaktozom suplementiranim oleinskom kiselinom (SD/GAL + C18:1) (slika 35). Kao i u prethodnom slučaju, analizirani su lipidni razredi: PA, PC, PE, PS, PI, TAG, DAG i LPC.



Slika 35. Ukupan sastav lipidnih razreda sojeva Y7092 (gore) i Y7092desa (dolje) sakupljenih u ranoj logaritamskoj fazi (OD 1.0), srednjoj logaritamskoj fazi (OD 4.0) i stacionarnoj fazi (OD stac., 48 sati) u mediju s galaktozom suplementiranim oleinskom kiselinom. Zbog niske koncentracije, razred LPC prikazan je na posebnom grafu.

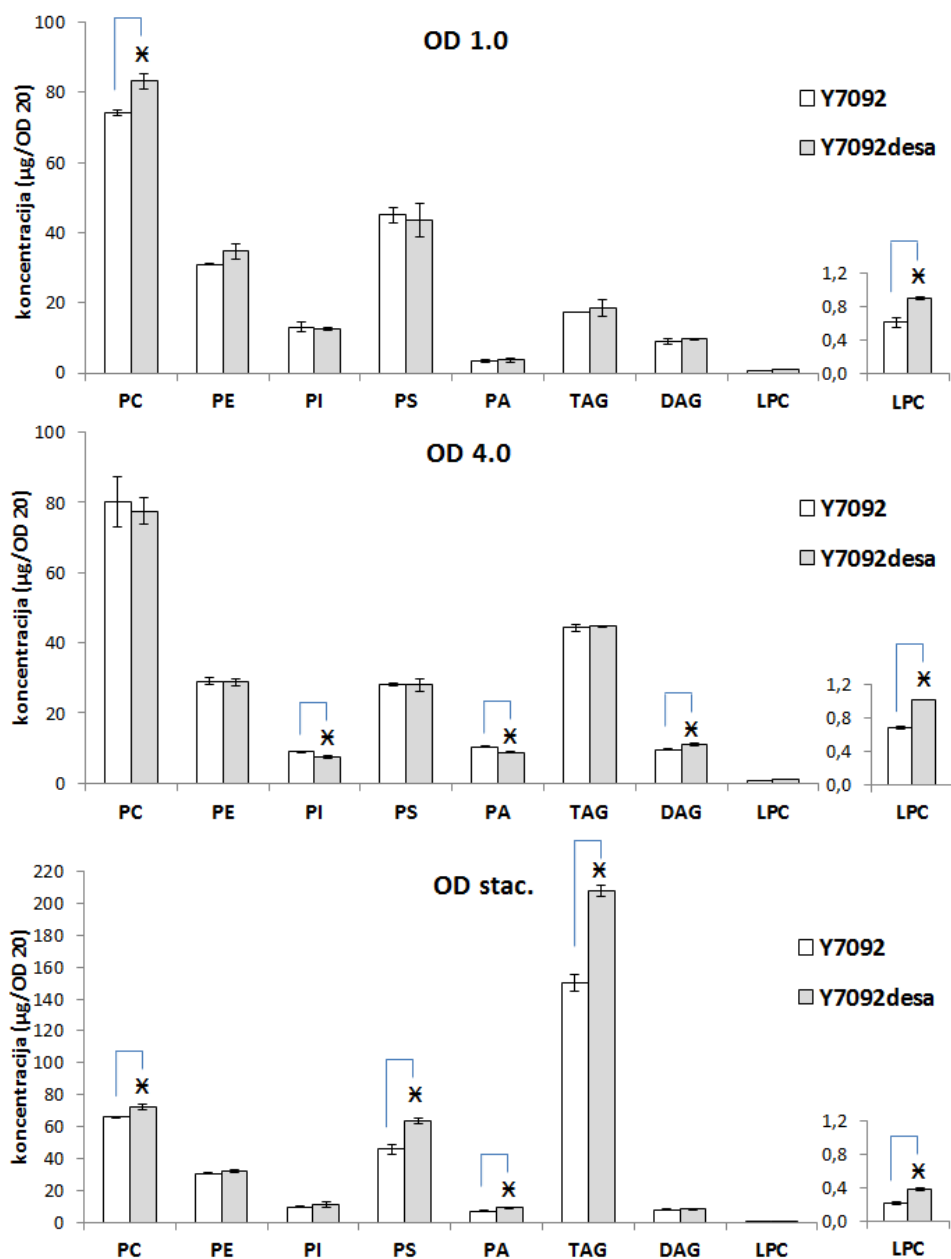
U uvjetima suplementacije, u oba soja slično kao i u mediju s galaktozom, došlo je do značajnih promjena u ukupnim količinama pojedinih lipidnih razreda kao posljedice promjene faze rasta (slika 35). Nadalje, zabilježene su značajne razlike u određenim lipidnim razredima u odnosu na uvjete bez suplementacije. U oba soja bio je primjetan trend manjeg snižavanja ukupnih količina razreda PC u stacionarnoj fazi, dok su PE zadržali slične količine u sve tri faze rasta. Slično kao i u mediju s galaktozom, razredi LPC i DAG pokazali su snižavanje ukupnih količina u stacionarnoj fazi u odnosu na prethodne dvije faze. Također, u oba soja, zadržao se trend povećanja ukupnih količina PA u srednjoj logaritamskoj fazi, s time da u soju Y7092desa nije došlo do smanjivanja ukupnih količina PA u stacionarnoj fazi. Nadalje, TAG su također pokazali sličan trend eksponencijalnog povećanja ukupnih količina od rane logaritamske do stacionarne faze, slično kao i u uvjetima bez suplementacije. Najveće promjene u odnosu na uvjete bez suplementacije zabilježene su u razredima PI i PS u ranoj logaritamskoj i stacionarnoj fazi. U ove dvije faze, u oba soja došlo je do značajnog povećanja ukupnih količina PS i snižavanja ukupnih količina PI. Međutim, zadržan je trend snižavanja ukupnih količina PI u srednjoj logaritamskoj fazi u oba soja. Zanimljivo, dok su ukupne količine PS bile gotovo konstantne u uvjetima bez suplementacije u sve tri faze rasta, u uvjetima suplementacije došlo je do pada ukupnih količina za skoro jednu polovinu u srednjoj logaritamskoj fazi, te njihovog ponovnog povećanja u stacionarnoj fazi, u oba soja.

Iako je u uvjetima suplementacije zabilježena slična dinamika promjena ukupnih količina lipidnih razreda ovisno o fazi rasta između dva soja, povećani udio PUFA uzrokovao je razlike u ukupnim količinama pojedinih lipidnih razreda u odnosu na kontrolni soj (slika 36). U ranoj logaritamskoj fazi povećani udio PUFA uzrokovao je povećanje ukupnih količina razreda PC i LPC ($p < 0,05$). U srednjoj logaritamskoj fazi, došlo je do izjednačavanja ukupnih količina PC između dva soja, dok su LPC zadržali povećanje iz prethodne faze rasta ($p < 0,05$). Također, u ovoj fazi, u soju $\Delta 12$ desaturazom došlo je do snižavanja ukupnih količina PI i PA, te povećanja ukupnih količina DAG ($p < 0,05$). U stacionarnoj fazi, LPC su zadržali povećanje ukupnih količina iz prethodne faze u soju Y7092desa ($p < 0,05$), unatoč značajnom snižavanju ukupnih količina razreda LPC u oba soja. Zanimljivo, u stacionarnoj fazi, u soju s $\Delta 12$ desaturazom došlo je do povećanja ukupnih količina razreda PC, PS, PA i TAG.

Kako bi se detaljnije istražile promjene koje se dešavaju tijekom prilagodbe stanica kvasca na povećanje udjela PUFA u uvjetima suplementacije, napravljena je analiza zastupljenosti lipidnih vrsta s obzirom na broj dvostrukih veza (kao i u mediju s galaktozom). U uvjetima suplementacije, u svim lipidnim razredima došlo je do povećanja proizvodnje

lipidnih vrsta koje sadrže oleinsku kiselinu, prvenstveno 34 i 36 lipidnih vrsta. Također, posljedično smanjenju udjela masnih kiselina s 16 ugljikovih atoma, snižena je i proizvodnja 32 lipidnih vrsta. Nadalje, u uvjetima suplementacije došlo je do povećanja udjela vrsta koje

Suplementacija 18:1



Slika 36. Usporedba ukupnog sastava pojedinih lipidnih razreda između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta (vremena) u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom suplementiranim oleinskom kiselinom.

sadrže PUFA u pojedinim lipidnim razredima (slika 45). U soju s $\Delta 12$ desaturazom, došlo je prvenstveno do povećanja proizvodnje 36 lipidnih vrsta koje sadrže linolnu kiselinu te manjim

djelom i 34 vrsta, dok su 32 vrste, koje sadrže heksadiensku kiselinu, bile značajno snižene u odnosu na uvjete bez suplementacije. Međutim, unatoč tome, 34:3 je u prosjeku, i u uvjetima suplementacije, ostala najzastupljenija vrsta koja sadrži PUFA u svim razredima glicerofosfolipida. Također, u pojedinim razredima glicerofosfolipida došlo je do povećanja udjela lipidnih vrsta s četiri dvostruke veze, iako su i ovdje one sačinjavale tek manji udio vrsta koje sadrže PUFA. Ovakva distribucija PUFA je u korelaciji s udjelima linolne i heksadienske kiseline u ukupnom sastavu masnih kiselina izmjerenim u uvjetima suplementacije (slika 34).

Unutar razreda PC, promjene u proizvodnji lipidnih vrsta, ovisno o fazi rasta, su velikim djelom usporedive s promjenama u uvjetima bez suplementacije (slika 37). U ranoj logaritamskoj fazi, unatoč povećanju vrsta koje sadrže linolnu kiselinu, ukupni udio vrsta koje sadrže PUFA bio je gotovo identičan kao i u uvjetima bez suplementacije (33%). Također slično, kao kompenzacija proizvodnji vrsta koje sadrže PUFA, došlo je do snižavanja ukupnih količina vrsta s jednom i dvije dvostruke veze. Međutim, posljedično povećanju količina lipidnih vrsta koje sadrže oleinsku kiselinu, u soju Y7092desa nije došlo do istovjetnog snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze, što je dovelo do povećanja ukupnih količina PC u odnosu na kontrolni soj. Također, i u uvjetima suplementacije, pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu došlo je do snižavanja stupnja nezasićenosti lipidnih vrsta, te je i u ovom slučaju, u soju Y7092desa, ova promjena bila isključivo regulirana snižavanjem vrsta koje sadrže PUFA za jednu polovinu (udio je pao na 18%). U stacionarnoj fazi, u oba soja, došlo je do snižavanja vrsta s jednom dvostrukom vezom, što je posljedično rezultiralo i snižavanjem ukupnih količina PC u ovoj fazi. U posljednje dvije faze rasta, proizvodnja lipidnih vrsta koje sadržavaju PUFA, bila je kompenzirana, u najvećem djelu snižavanjem vrsta s jednom dvostrukom vezom. U stacionarnoj fazi došlo je do manjeg povećanja proizvodnje vrsta koje sadrže PUFA (36:3), što je uz snižavanje ukupnih količina PC dovelo do povećanja njihovog udjela na 21% (razlika u odnosu na uvjete bez suplementacije). Također, snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom, u stacionarnoj fazi, nije bilo dovoljno da kompenzira proizvodnju vrsta koje sadrže PUFA, što je dovelo do povećanja ukupnih količina PC u odnosu na kontrolni soj.

Povećanje udjela PUFA nije uzrokovalo razlike u ukupnim količinama PE između dva soja (slika 38). Kao i u uvjetima bez suplementacije, i u oba soja, unutar razreda PE zabilježene su puno manje promjene u lipidnim vrstama ovisno o fazi rasta. Udio vrsta koje sadrže PUFA bio je povećan (25%), međutim, kao i u mediju s galaktozom nije došlo do

značajnih promjena njihovih udjela u sve tri fazi rasta. Također slično, proizvodnja vrsta koje sadrže PUFA, u sve tri faze rasta, bila je kompenzirana isključivo snižavanjem vrsta s dvije dvostruke veze. Nadalje, kao i u uvjetima bez suplementacije, pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu došlo je do manjeg snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze, dok je u stacionarnoj fazi došlo do manjeg povećanja vrsta s jednom dvostrukom vezom.

Povećani udio PUFA, nije uzrokovao razliku u ukupnim količinama PS u prve dvije faze rasta (razlika u odnosu na uvjete bez suplementacije); u soju Y7092desa, došlo je do sniženja vrsta s dvije dvostruke veze kao kompenzacija vrstama koje sadrže PUFA (slika 39). Udio vrsta s tri dvostruke veze, u prve dvije faze rasta, bio je nešto viši u odnosu na nesuplementirane stanice (10 - 13%); međutim također niži u usporedbi s razredima PC i PE. Nadalje, u odnosu na uvjete bez suplementacije, u ranoj logaritamskoj fazi, u oba soja došlo je do velikog povećanja ukupnih količina PS (za oko 70%), dok su u srednjoj logaritamskoj fazi ukupne količine PS bile snižene na sličnu razinu kao i u uvjetima bez suplementacije. Unatoč tome, relativni udjeli vrsta u prve dvije faze rasta ostali su gotovo nepromijenjeni unutar svakog soja (sličan trend kao i u mediju s galaktozom). U stacionarnoj fazi, ponovno je došlo do povećanja ukupnih količina PS u oba soja, s time da su u soju Y7092desa ukupne količine bile veće za oko 40% u odnosu na kontrolni soj. Slično kao i u uvjetima bez suplementacije, došlo je do dvostrukog porasta udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom, te snižavanja udjela vrsta s dvije dvostruke veze. U soju Y7092desa pad nezasićenosti bio je djelom reguliran smanjenjem proizvodnje vrsta s tri dvostruke veze, čiji je udio pao na 2% (sličan trend kao i u mediju s galaktozom). Unatoč snižavanju udjela vrsta koje sadrže PUFA u stacionarnoj fazi, zanimljivo je da je u soju Y7092desa došlo do povećanja ukupnih količina PS, čemu je podjednako pridonijelo povećanje vrsta s jednom i s dvije dvostruke veze.

Povećani udio PUFA nije uzrokovao razlike u ukupnim količinama PI u ranoj logaritamskoj i stacionarnoj fazi u odnosu na kontrolu, dok su u srednjoj logaritamskoj fazi ukupne količine PI bile snižene u odnosu na kontrolni soj za oko 15% ($p < 0,05$) (slika 40). Slično kao i u mediju s galaktozom, PUFA su uzrokovale povećanje lipidnih vrsta s dvije dvostruke veze te kompenzacijsko snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom, s time da je udio vrsta koje sadrže PUFA također bio niži od 5% u sve tri faze rasta. U uvjetima suplementacije, došlo je do snižavanja ukupnih količina PI u oba soja u ranoj logaritamskoj i stacionarnoj fazi (za oko 50%), ali je, kao i u mediju s galaktozom, zadržan trend snižavanja ukupnih količina PI u srednjoj logaritamskoj fazi. U stacionarnoj fazi ponovno je došlo do

manjeg povećanja ukupnih količina. Međutim, kada se uspoređuju relativni udjeli pojedinih lipidnih vrsta, svaki soj zadržao je slične udjele pojedinih lipidnih vrsta neovisno o fazi rasta.

Unutar razreda DAG, povećani udio PUFA uzrokovao je povećanje ukupnih količina u srednjoj logaritamskoj fazi ($p < 0,05$), dok su u ostale dvije faze ukupne količine bile nepromijenjene u odnosu na kontrolni soj (slika 41). Slično kao i u mediju s galaktozom, u ranoj logaritamskoj fazi došlo je do podjednakog snižavanja vrsta s jednom i dvije dvostruke veze, kao kompenzacija proizvodnji vrsta koje sadrže PUFA, čiji je udio također bio oko 30%. Prilikom prijelaza u srednju logaritamsku fazu, u kontrolnom soju došlo je do snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze, te sličnog povećanja vrsta s jednom dvostrukom vezom te su ukupne količine ostale su nepromijenjenije. Suprotno tome, u soju Y7092desa došlo je do manjeg povećanja vrsta s jednom i dvije dvostruke veze, dok su vrste s tri i četiri dvostruke veze pokazale manje sniženje ukupnih količina, što je rezultiralo i padom udjela vrsta koje sadrže PUFA na 20%, ali i povećanjem ukupnih količina DAG u odnosu na kontrolu za oko 15% ($p < 0,05$) (sličan trend kao i u mediju s galaktozom). U srednjoj logaritamskoj fazi, proizvodnja lipidnih vrsta koje sadrže PUFA isključivo je bila kompenzirana sniženjem vrsta s jednom dvostrukom vezom (slično kao i mediju s galaktozom), s time da je došlo do manjeg povećanja vrsta s dvije dvostruke veze u odnosu na kontrolu. U stacionarnoj fazi, u oba soja, došlo je do snižavanja ukupnih količina DAG za 20-30%, posljedično snižavanju vrsta s jednom dvostrukom vezom za skoro jednu polovinu. Međutim, u soju Y7092 također je došlo i do manjeg povećanja vrsta s dvije dvostruke veze, dok je u soju Y7092desa zabilježen manji pad ovih vrsta, što je rezultiralo njihovom manjom količinom u soju Y7092desa u odnosu na kontrolu. Posljedično tome, u stacionarnoj fazi, proizvodnja vrsta koje sadrže PUFA bila je kompenzirane snižavanjem vrsta s jednom i s dvije dvostruke veze (slično kao i ranoj logaritamskoj fazi). U odnosu na prethodnu fazu, vrste koje sadrže PUFA zadržale su slične količine, što je s obzirom na snižavanje ukupnih količina rezultiralo i povećanjem njihovog udjela na 25%.

Za razliku od uvjeta bez suplementacije, povećani udio PUFA, uzrokovao je značajne promjene u ukupnim količinama PA između dva soja u srednjoj logaritamskoj i stacionarnoj fazi (slika 42). Slično kao i u uvjetima bez suplementacije, unutar razreda PA udio vrsta koje sadrže PUFA bio je nepromijenjen u prve dvije faze rasta, iako nešto viši (13,5%). Također, u ranoj logaritamskoj fazi proizvodnja vrsta koje sadrže PUFA bila je kompenzirana sniženom proizvodnjom vrsta s jednom dvostrukom vezom. U srednjoj logaritamskoj fazi, u oba soja, došlo je do povećanja proizvodnje ukupnih količina PA, s time da je u kontrolnom soju došlo

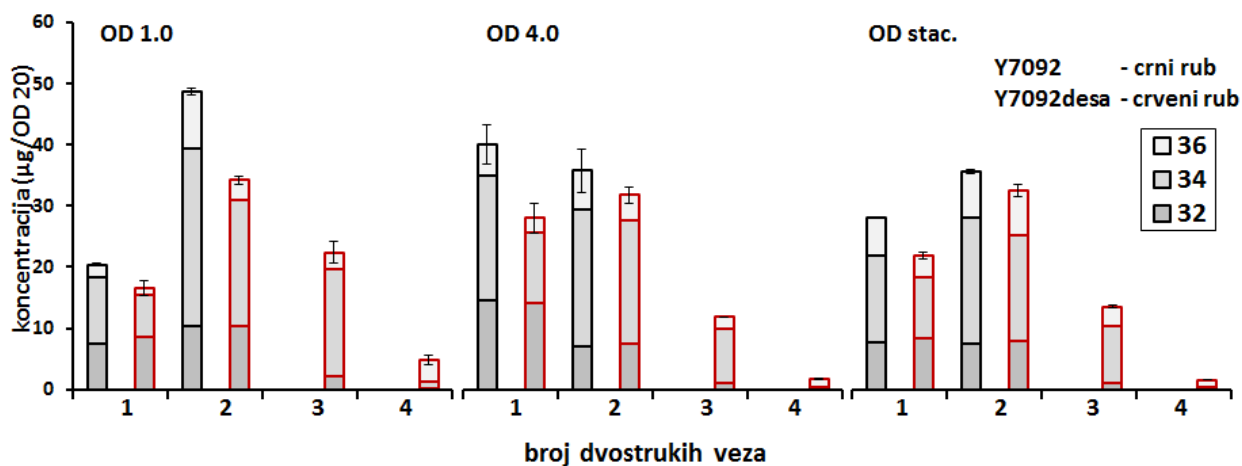
do trostrukog povećanja, a u soju Y7092desa do dvostrukog. Ovakve promjene rezultirale su povećanjem ukupnih količina PA za 15% ($p < 0,05$) u kontrolnom soju, iako su oba soja zadržala slične relativne udjele vrsta kao u prethodnoj fazi. U stacionarnoj fazi, u kontrolnom soju došlo je do snižavanja ukupnih količina za jednu trećinu, dok su u soju Y7092desa ukupne količine ostale na razini iz prethodne faze. Ovakve promjene rezultirale su povećanjem ukupnih količina PA u soju Y7092desa za 30% ($p < 0,05$), s time da su relativni udjeli vrsta ovisno o broju dvostrukih veza također ostali gotovo nepromijenjeni. Međutim, slično kao i u uvjetima bez suplementacije, tijekom progresije kroz faze rasta bio je primjetan trend manjeg porasta udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom te snižavanja udjela vrsta s dvije dvostruke veze. Nadalje, slično kao i u mediju s galaktozom, u stacionarnoj fazi, u soju Y7092desa pad nezasićenosti vrsta PA bio je prvenstveno reguliran snižavanjem udjela vrsta koje sadrže PUFA za skoro jednu polovinu (7,5%).

Kao posljedica suplementacije došlo je do povećanja ukupnih količina LPC u oba soja za više od 50%, u sve tri faze rasta (slika 43). U srednjoj logaritamskoj fazi, u oba soja, došlo je do manjeg povećanja ukupnih količina LPC. Također, kao i u mediju s galaktozom, u soju Y7092desa zabilježen je porast ukupnih količina LPC u sve tri faze rasta ($p < 0,05$). Nadalje, iako je u srednjoj logaritamskoj fazi došlo do snižavanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PC, u razredu LPC zadržano je povećanje ukupnih količina za oko 50% iz prethodne faze (razlika u odnosu na uvjete bez suplementacije). U stacionarnoj fazi, slično kao i uvjetima bez suplementacije, u oba soja došlo je do smanjenja ukupnih količina LPC za 60 - 70%. Međutim, kao posljedica povećanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PC, došlo je i do povećanja razlike ukupnih količina LPC za 85%, što je također velika razlika u odnosu na uvjete bez suplementacije. Zanimljivo, iako je u različitim fazama rasta došlo do promjena ukupnih količina LPC, svaki soj zadržao je slične relativne udjele vrsta ovisno o broju dvostrukih veza. U soju Y7092desa zabilježen je trend manjeg povećanja vrsta s jednom dvostrukom vezom, te snižavanja vrsta s dvije dvostruke veze. Nadalje, iako je udio vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PC bio sličan u prve dvije faze rasta kao i u uvjetima bez suplementacije, udio vrsta LPC koje sadrže PUFA bio je značajno povišen (37% u ranoj logaritamskoj i 31% u srednjoj logaritamskoj fazi), što je vjerojatno posljedica povećanja udjela linolne kiseline unutar razreda PC.

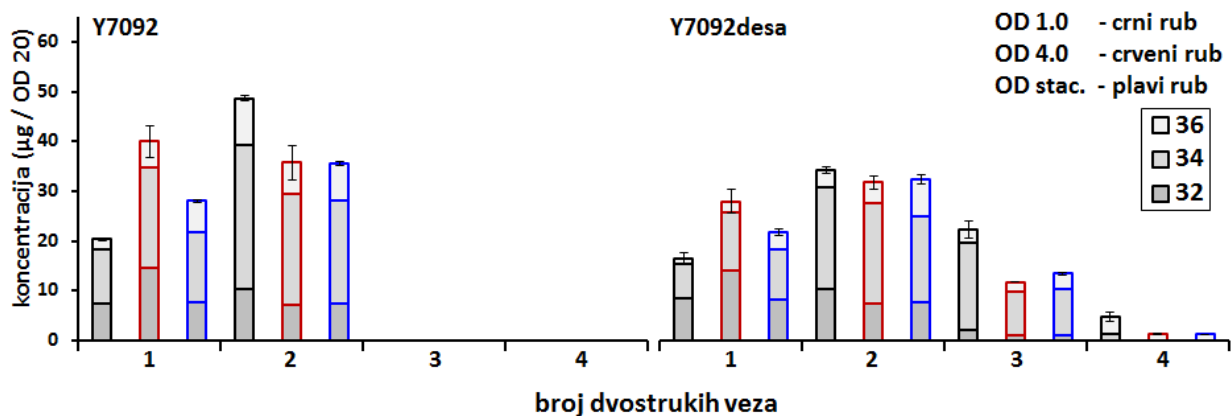
U uvjetima suplementacije, došlo je do povećanja ukupnih količina TAG u oba soja za 25-50%, ovisno o soju te fazi rasta, premda je zadržan trend eksponencijalnog povećanja ukupnih količina TAG tijekom progresije kroz faze rasta (slika 44). Tijekom prve dvije faze

rasta povećani udio PUFA nije uzrokovao statistički značajnu razliku u ukupnim količinama TAG u odnosu na kontrolu, ali je u stacionarnoj fazi došlo do značajnog povećanja ukupnih količina za skoro 40% ($p < 0,05$). Kao i u mediju s galaktozom, u ranoj logaritamskoj fazi, kao kompenzacija proizvodnji vrsta koje sadrže PUFA, smanjena je proizvodnja vrsta s jednom i dvije dvostruke veze. Međutim, vrste koje sadrže PUFA sačinjavale su 20% ukupnog udjela TAG, što je gotovo dvostruko više u odnosu na uvjete bez suplementacije. Kada se analiziraju relativni udjeli, došlo je do sličnih promjena pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu, kao i u mediju s galaktozom. U kontrolnom soju zabilježen je veliki porast vrsta s jednom dvostrukom vezom te kompenzacijski pad udjela vrsta s tri dvostruke veze, dok je soju Y7092desa došlo do puno manjeg pada udjela vrsta s tri dvostruke veze te manjeg porasta udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom. Posljedično tome, kao i u mediju s galaktozom, Y7092desa soj je imao snižene količine vrsta s jednom i dvije dvostruke veze, međutim došlo je do povećanja količina vrsta s tri dvostruke veze. Nadalje, kao i u mediju s galaktozom, zadržan je trend smanjenja udjela vrsta s četiri i pet dvostrukih veza pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu (15%), s time da je njihov udio još uvijek bilo gotovo dvostruko veći u odnosu na uvjete bez suplementacije. U kontrolnom soju, u stacionarnoj fazi, ukupni udjeli vrsta ovisno o broju dvostrukih veza bili su gotovo identični kao i u ranoj logaritamskoj fazi (unatoč deset puta većoj ukupnoj količini i određenim razlikama u udjelima pojedinačnih vrsta), što je također sličan trend kao i u mediju s galaktozom. Bez obzira na povećanje ukupnih količina od 40% u soju Y7092desa, relativni udjeli vrsta također su bili slični kao i u ranoj logaritamskoj fazi; s tom razlikom da je osim povećanja udjela vrsta s dvije dvostruke veze, došlo i do manjeg povećanja udjela vrsta s tri dvostruke veze (razlika u odnosu na uvjete bez suplementacije). Ukupni udio vrsta koje sadrže PUFA ostao je na razini iz prethodne faze (15,5%), što je također trend sličan kao i u mediju s galaktozom, iako je zadržan njihov dvostruko veći udio u odnosu na uvjete bez suplementacije.

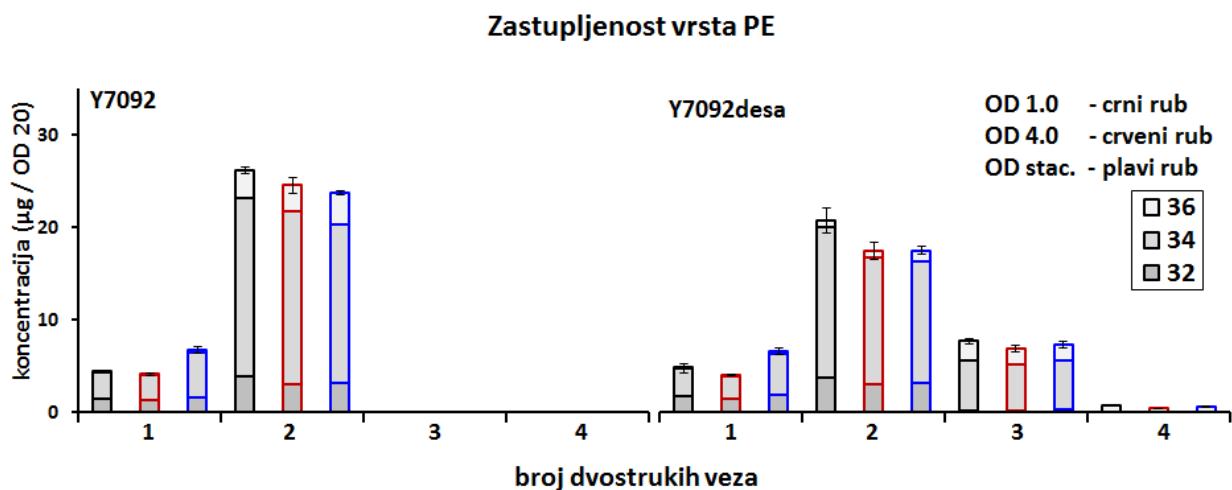
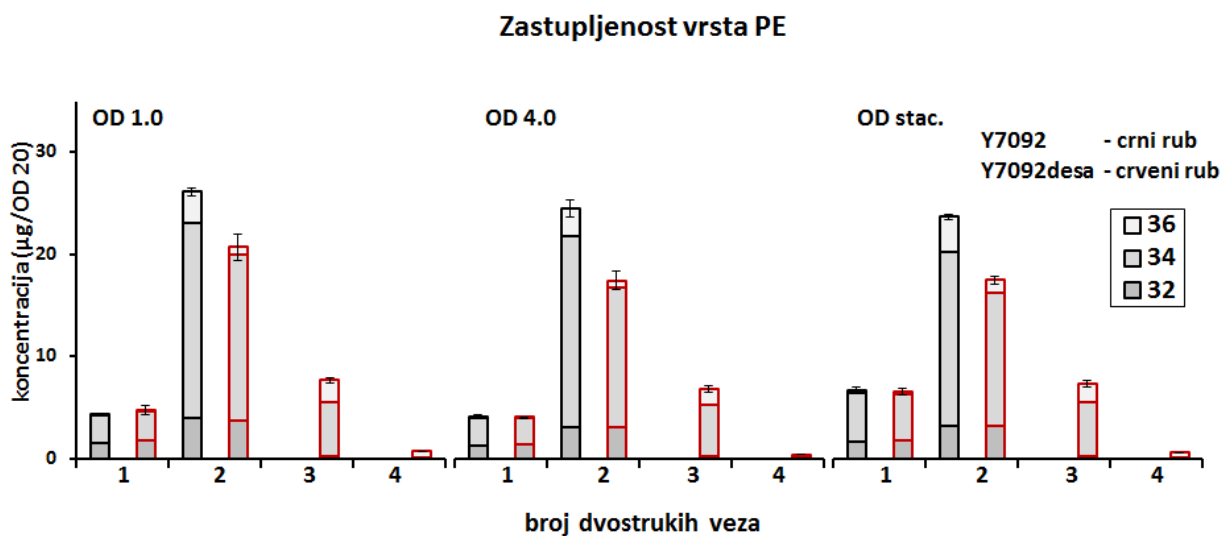
Zastupljenost vrsta PC



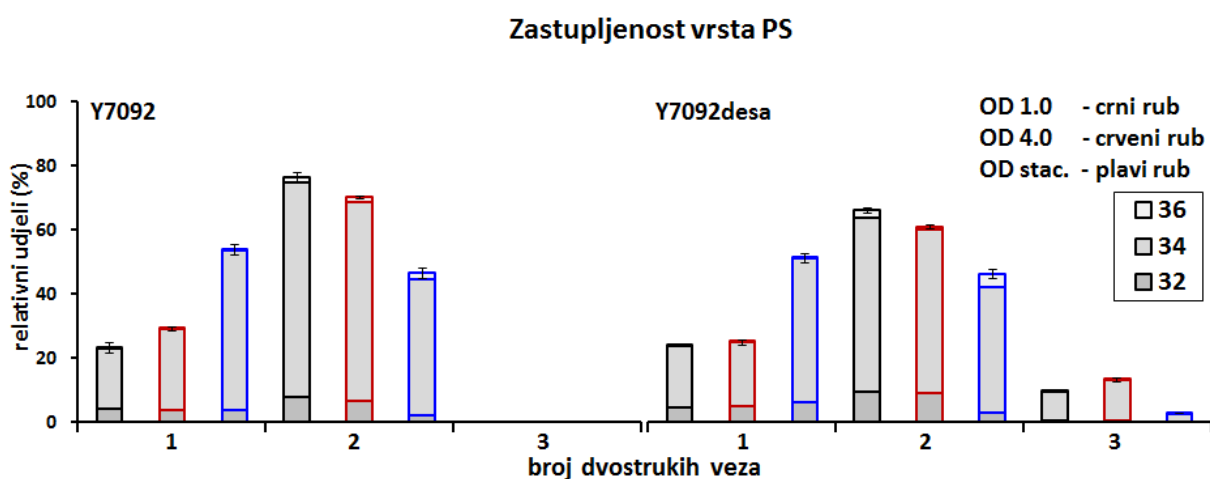
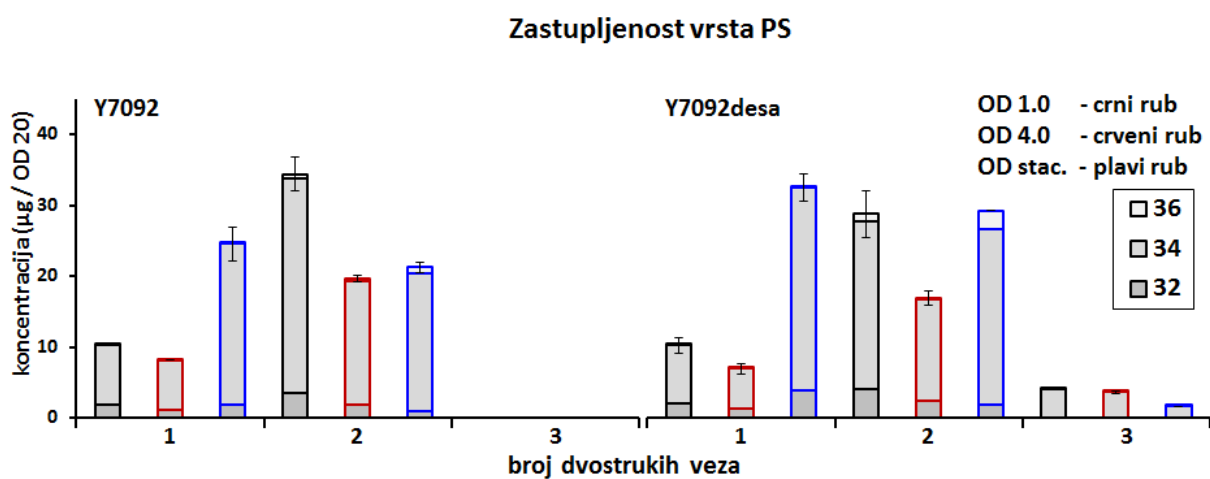
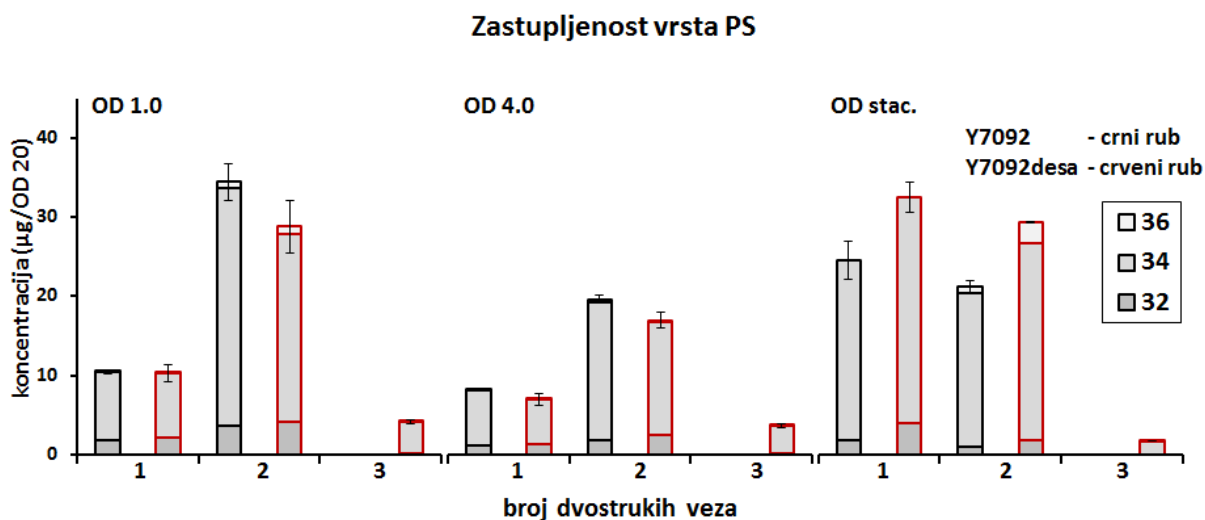
Zastupljenost vrsta PC



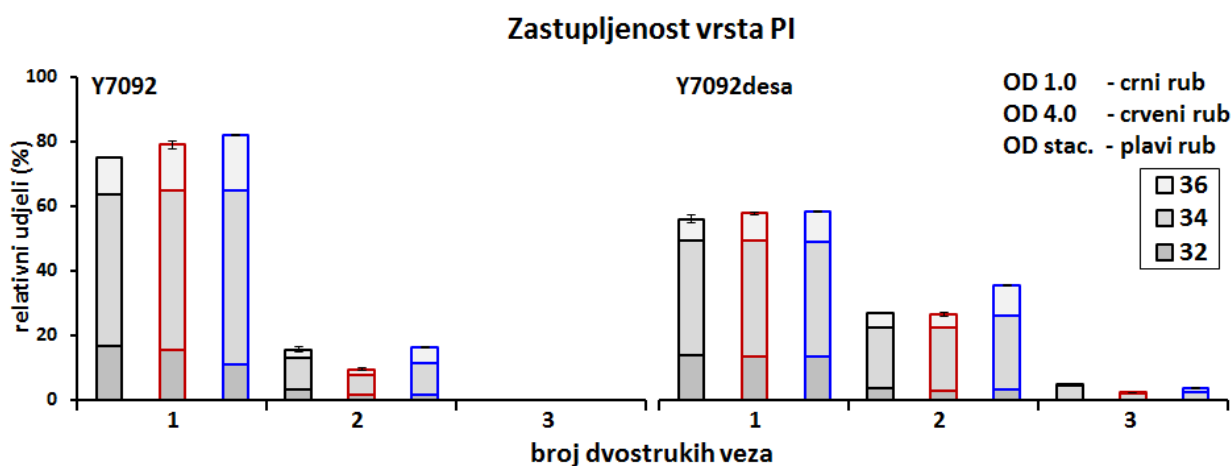
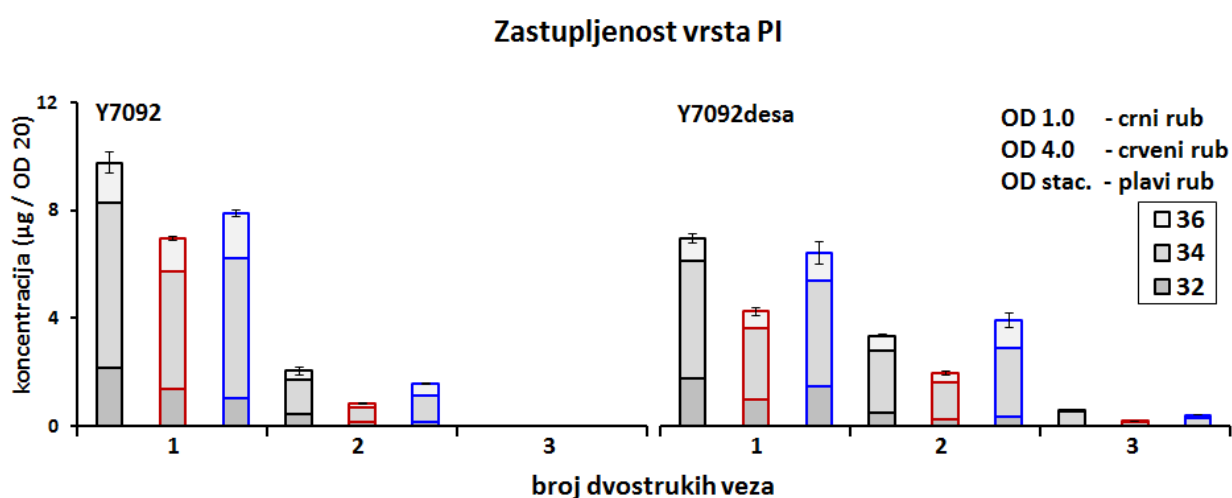
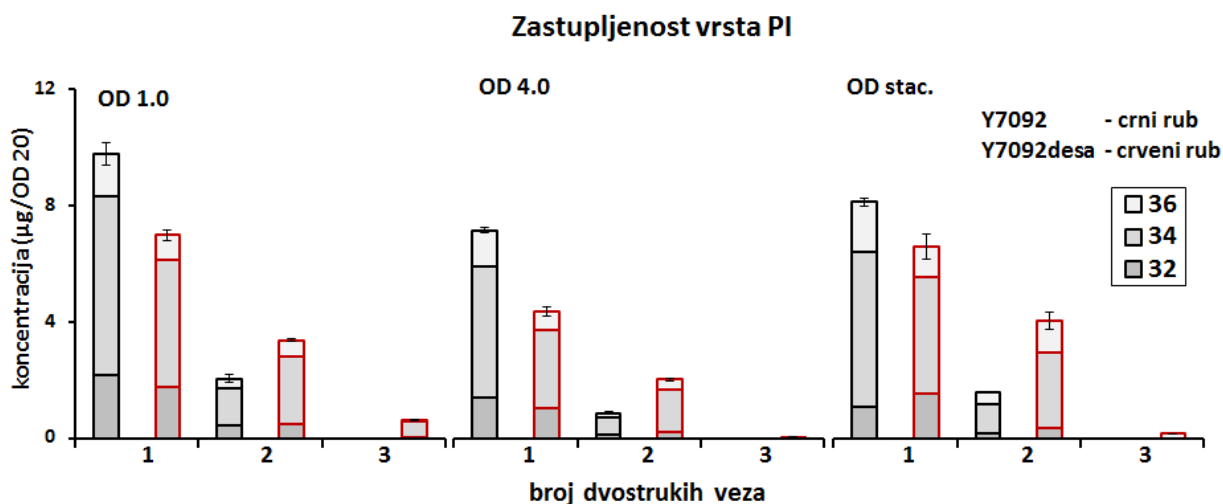
Slika 37. Usporedba najzastupljenijih vrsta PC ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena najzastupljenijih vrsta PC ovisno o broju dvostrukih veza u soju Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (dolje).



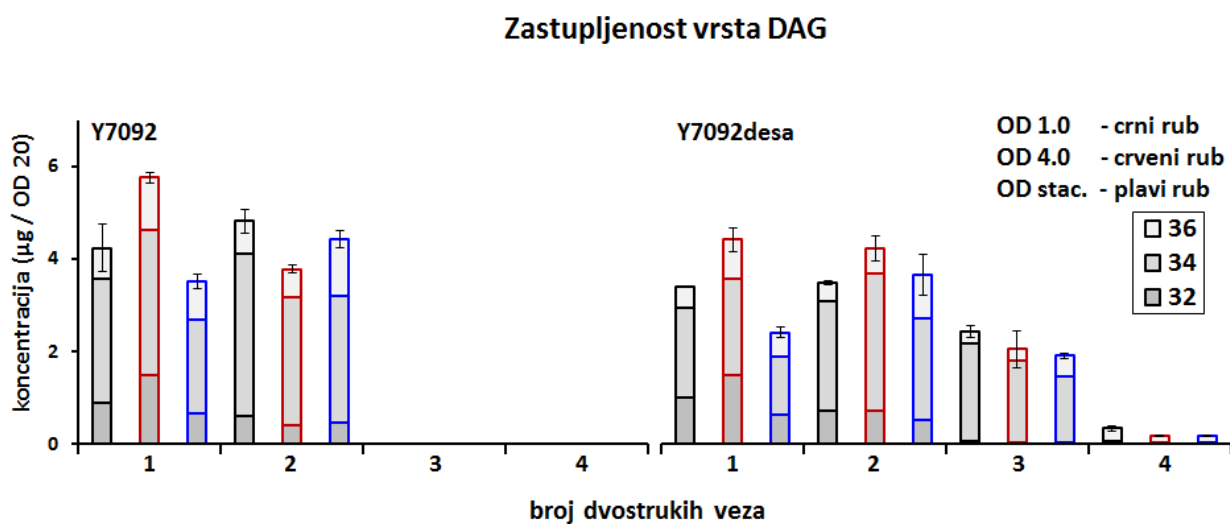
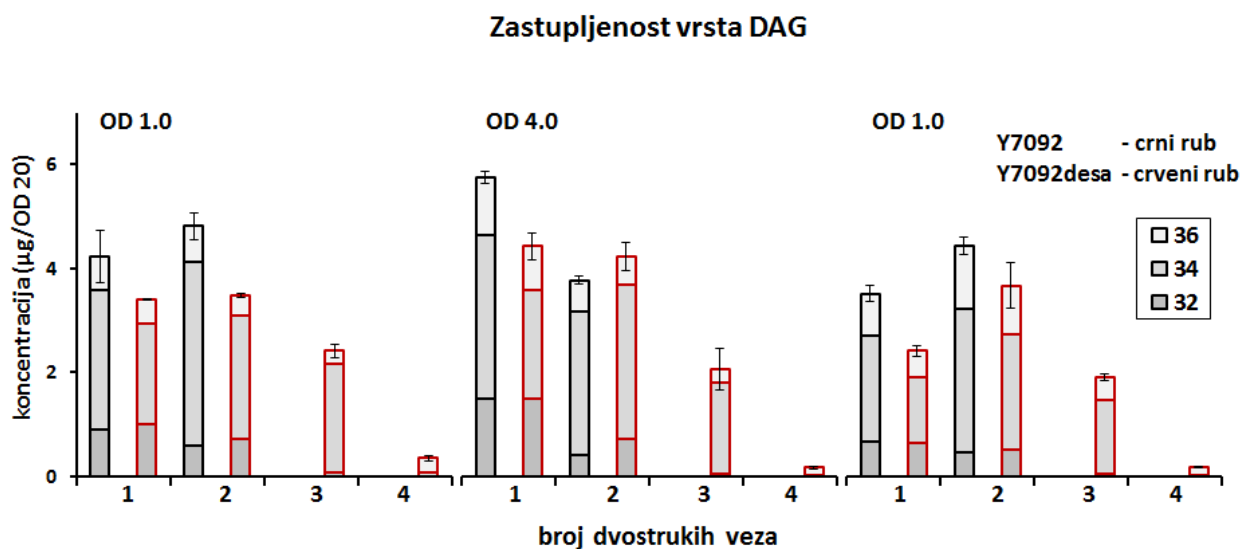
Slika 38. Usporedba najzastupljenijih vrsta PE ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena najzastupljenijih vrsta PE ovisno o broju dvostrukih veza u soju Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (dolje).



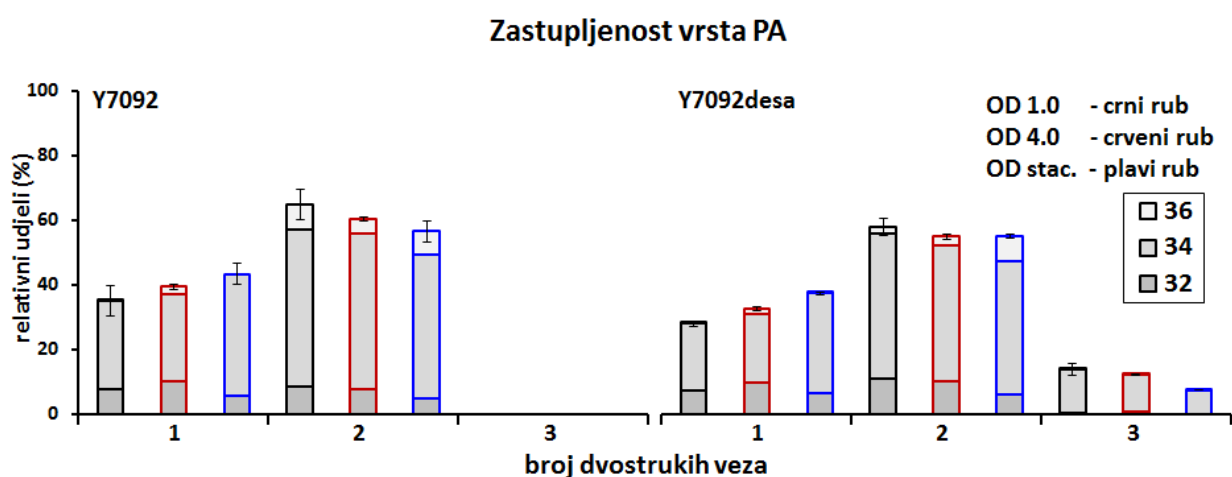
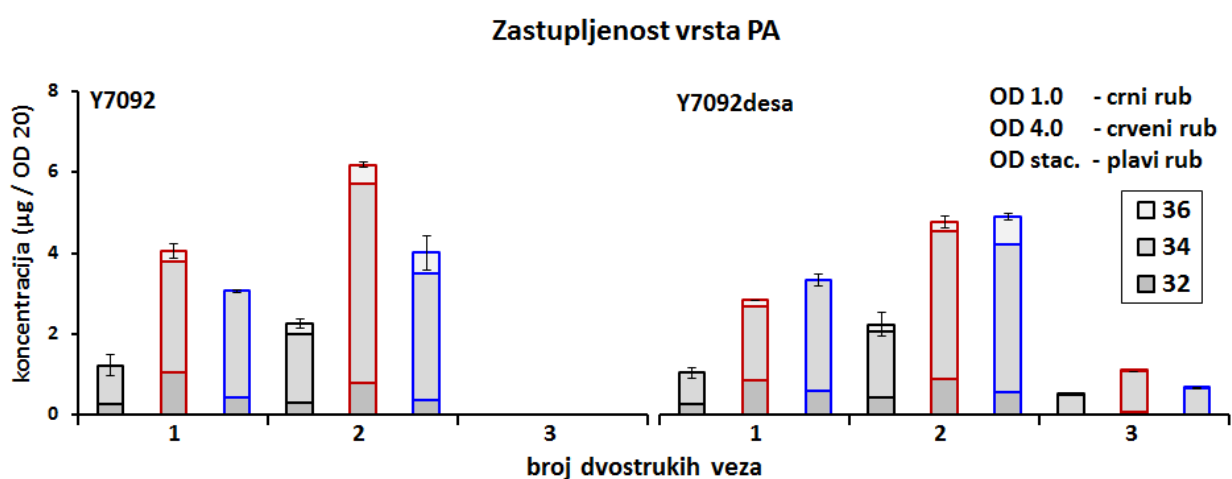
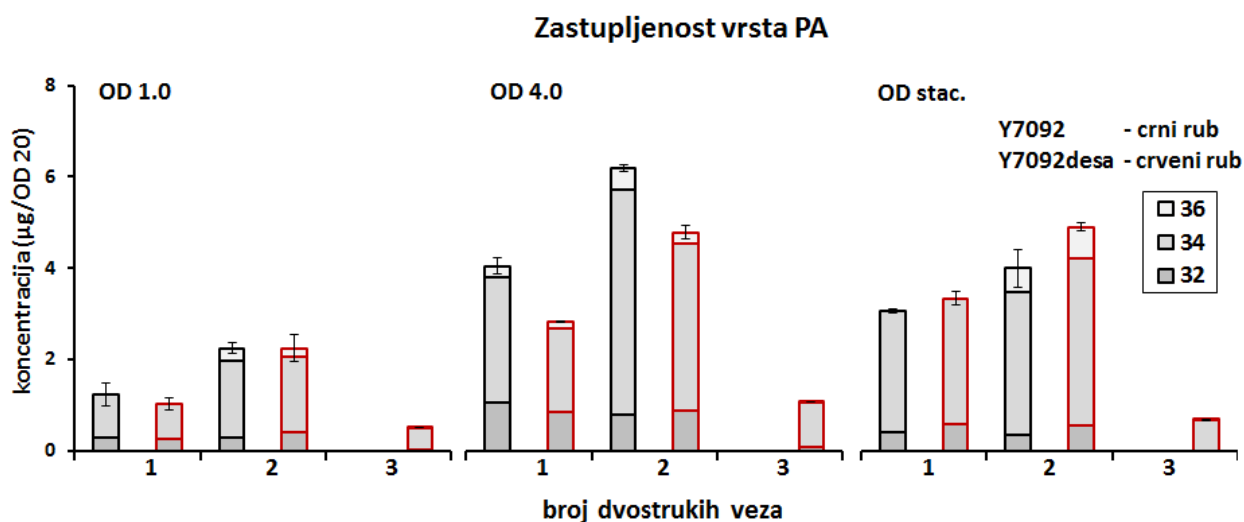
Slika 39. Usporedba najzastupljenijih vrsta PS ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta PS ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).



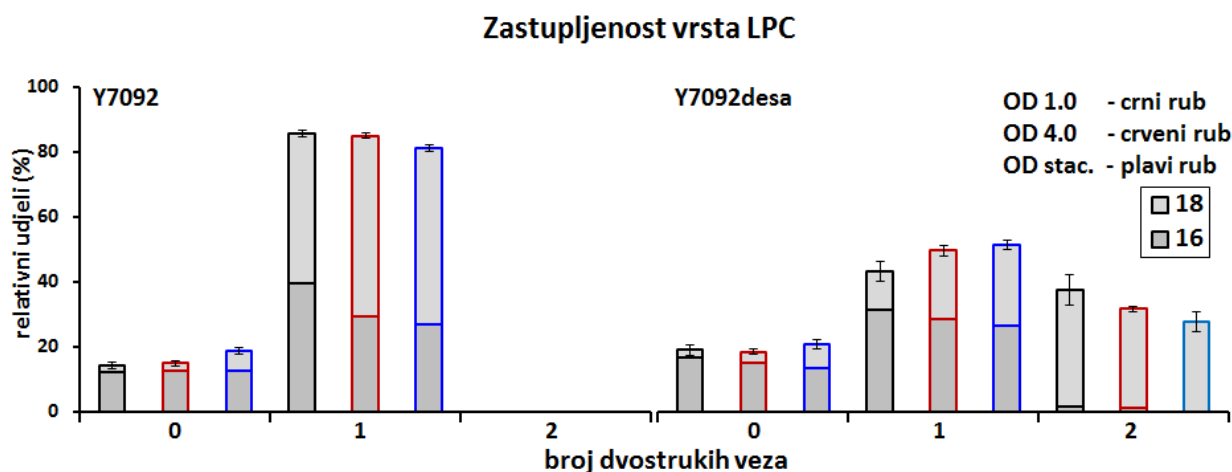
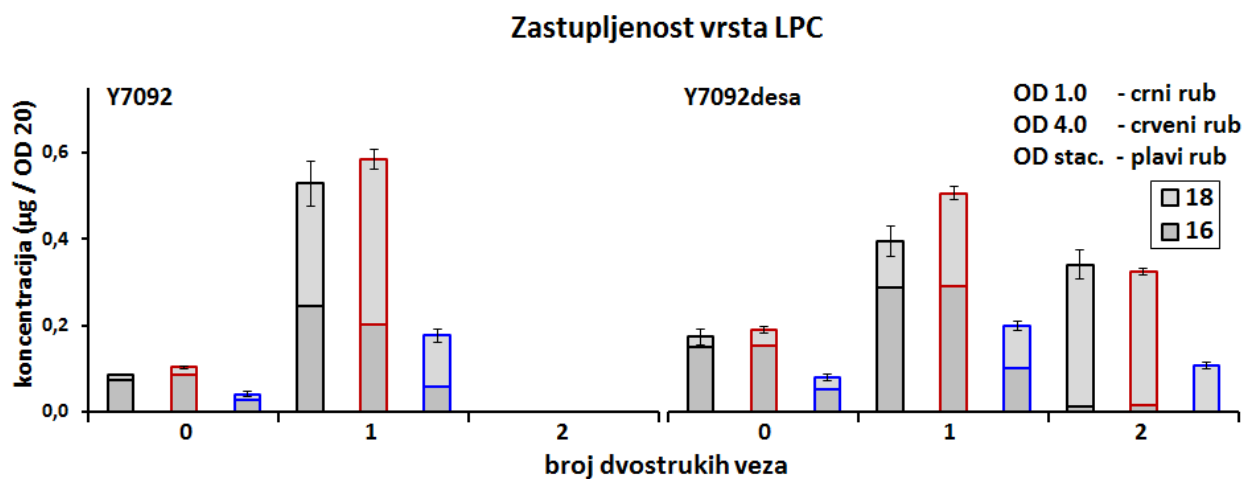
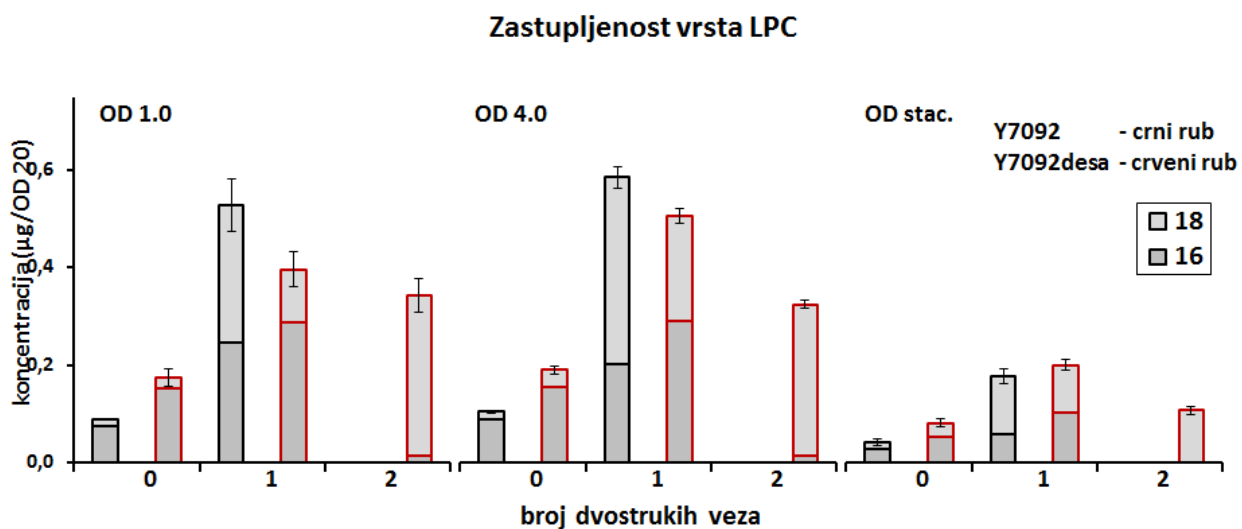
Slika 40. Usporedba najzastupljenijih vrsta PI ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta PI ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).



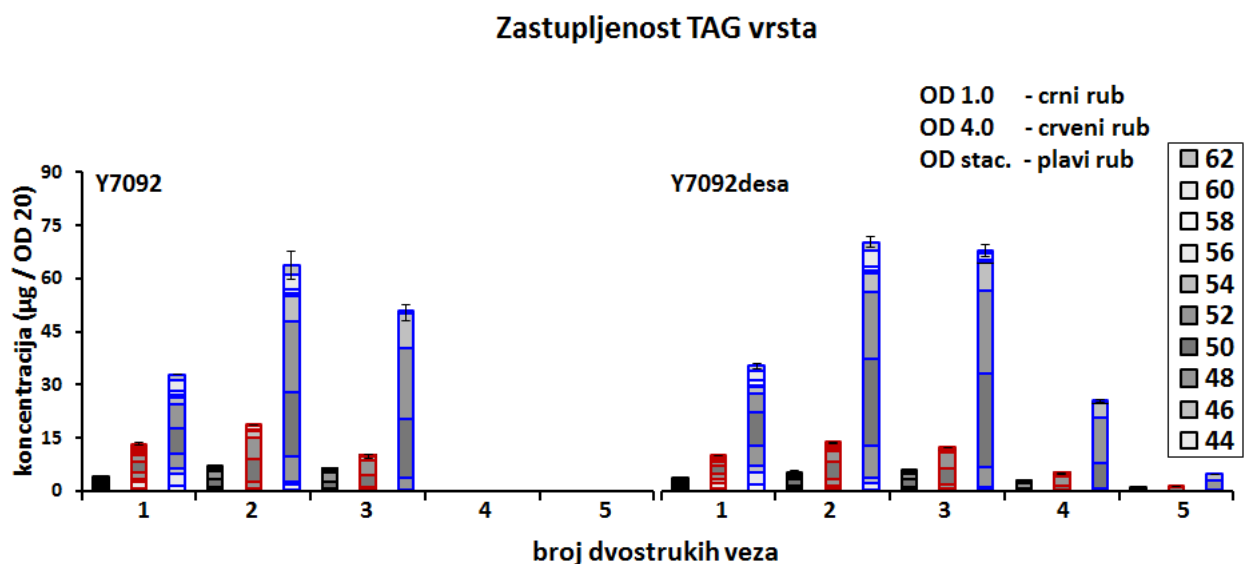
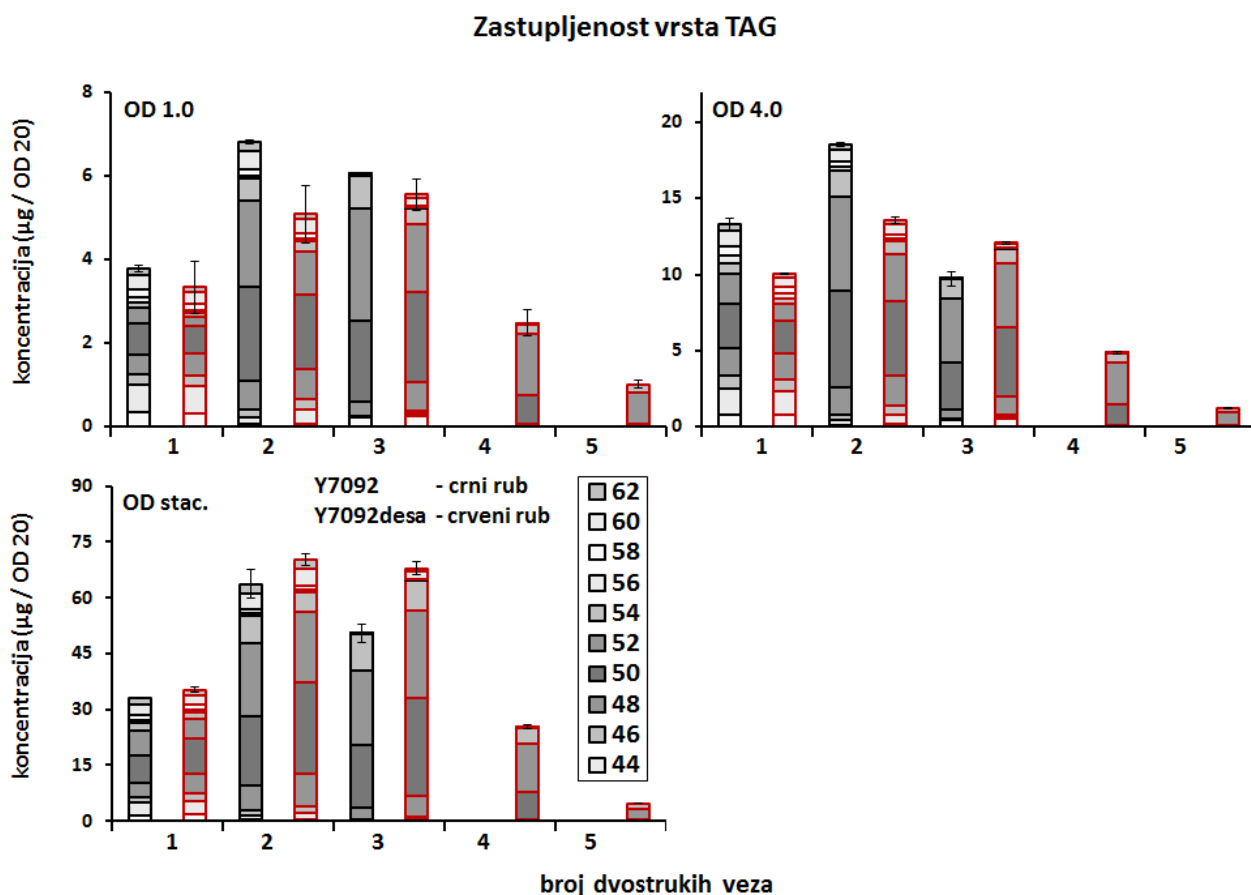
Slika 41. Usporedba najzastupljenijih vrsta DAG ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena najzastupljenijih vrsta DAG ovisno o broju dvostrukih veza u soju Y7092 i Y7092desa u tri različite faze (vremena) u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (dolje).



Slika 42. Usporedba najzastupljenijih vrsta PA ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta PA ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).

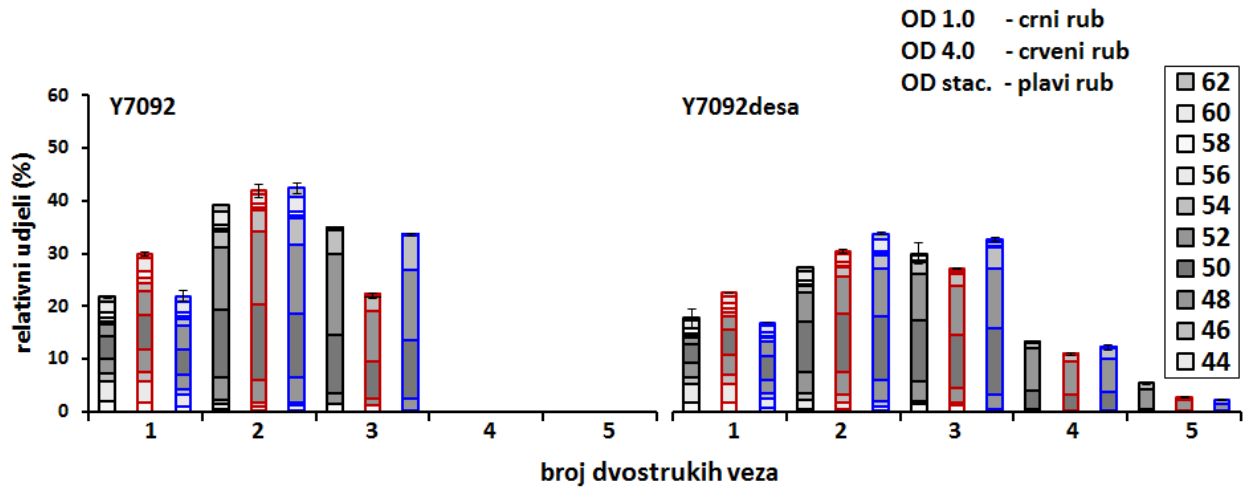


Slika 43. Usporedba najzastupljenijih vrsta LPC ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta LPC ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (dolje).

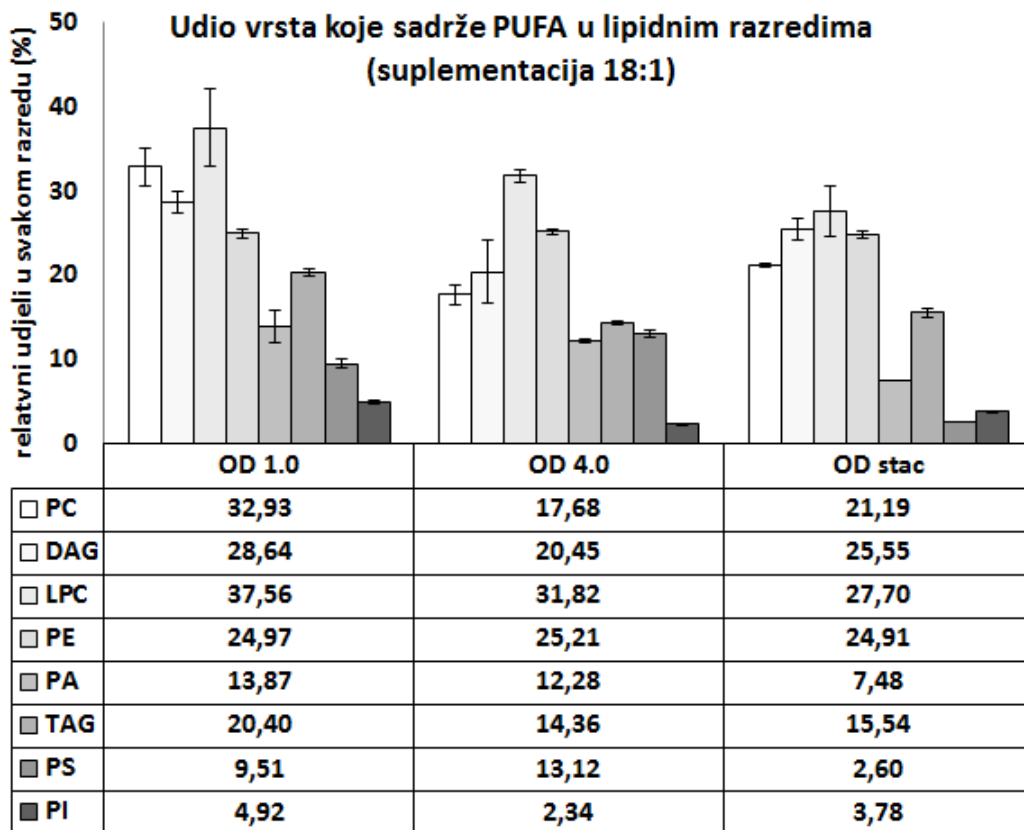


Slika 44. Usporedba najzastupljenijih vrsta TAG ovisno o broju dvostrukih veza između sojeva Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (gore). Usporedba dinamike promjena koncentracije najzastupljenijih vrsta TAG ovisno o broju dvostrukih veza u sojevima Y7092 i Y7092desa u tri različite faze rasta u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom i oleinskom kiselinom (sredina), te ista usporedba prikazana pomoću relativnih udjela (iduća strana).

Zastupljenost vrsta TAG



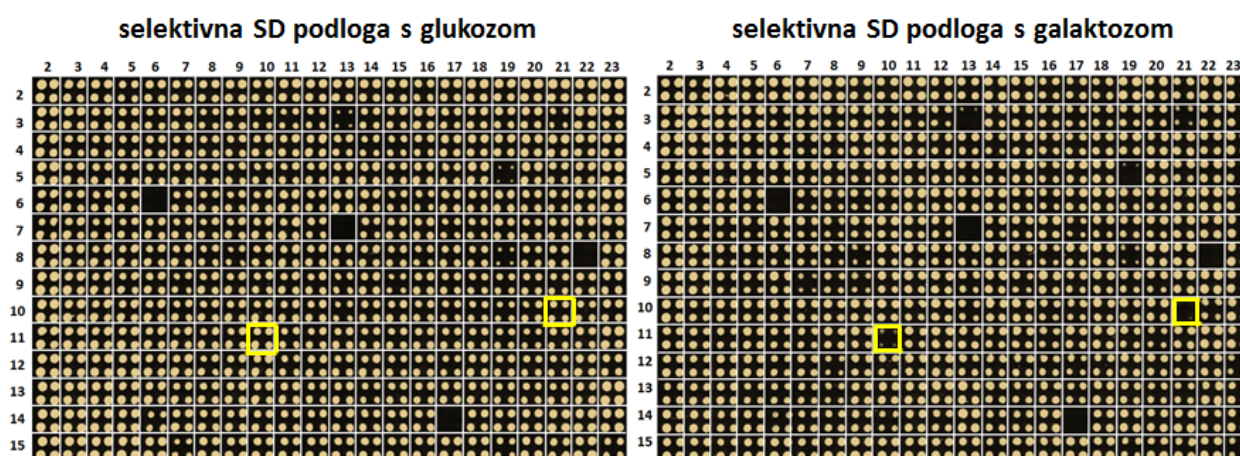
Slika 44. Nastavak.



Slika 45. Promjene u udjelima vrsta koje sadrže PUFA u analiziranim lipidnim razredima, ovisno o fazi rasta u mediju s galaktozom suplementiranim oleinskom kiselinom.

3.4. „SYNTHETIC GENETIC ARRAY“ – SGA

Cilj ove metode bio je identificirati gene uključene u regulaciju metabolizma PUFA u stanici kvasca u fiziološkim uvjetima na podlozi s galaktozom i u uvjetima oksidacijskog stresa na podlozi s galaktozom i tBH. Za ispitivanje učinaka PUFA na rast jednostrukih mutanata, u posljednjem koraku selekcije kolonije su nasađene u tehničkim kvadriplikatima na podlogu s galaktozom, kako bi se inducirala ekspresija $\Delta 12$ desaturaze (slika 46).



Slika 46. Primjer rasta „dvostrukih“ mutanata dobivenih metodom SGA nakon zadnjeg koraka selekcije na selektivnoj SD podlozi sa glukozom (lijevo) i galaktozom (desno). Prikazani su sojevi s pločice 3/14, a žutim kvadratićem, kao primjer, označeni su sojevi koji su pokazali snažnu inhibiciju rasta na podlozi s galaktozom.

Metodom SGA identificirano je 78 jednostrukih mutanata, koji su u prisutnosti PUFA pokazali barem 50%-tni zastoj u rastu na podlozi s galaktozom (tablica 8). Izabrani mutanti (geni) grupirani su prema staničnim procesima (tablica 9). Veliki broj identificiranih mutanata spadao je u kategoriju „*petite*“ mutanata, u kojima kao posljedica nedostatka gena dolazi do oštećenja respiratornog lanca, te im je otežan rast na podlogama s ne fermentabilnim izvorima ugljikovodika. Budući da galaktoza predstavlja više respiratorni izvor šećera u odnosu na glukozu [176, 177], defekti u rastu ovih mutanata bili su isključivo posljedica nemogućnosti rasta na podlozi s galaktozom. Također, veliki broj identificiranih gena pripadao je u grupu gena uključenih u proces metabolizma galaktoze (porodica gena *GAL*), te je izostanak rasta i u ovim sojevima bio isključivo posljedica nemogućnosti ili otežanog rasta na galaktozi, neovisno o prisutnosti PUFA. Dodatnim analizama, potvrđeno je da su defekti u rastu ostalih mutanata bili isključivo posljedica utjecaja galaktoze.

Tablica 8. Popis 78 identificiranih „dvostrukih“ mutanata (gena), koji su pokazali najjači inhibitorni učinak u rastu na podlozi s galaktozom. Geni su poredani prema koeficijentu (K1) koji označava jačinu inhibicije rasta, s time da 0 označava potpuni zastoj rasta u mutantima bez navedenog gena i u prisutnosti PUFA.

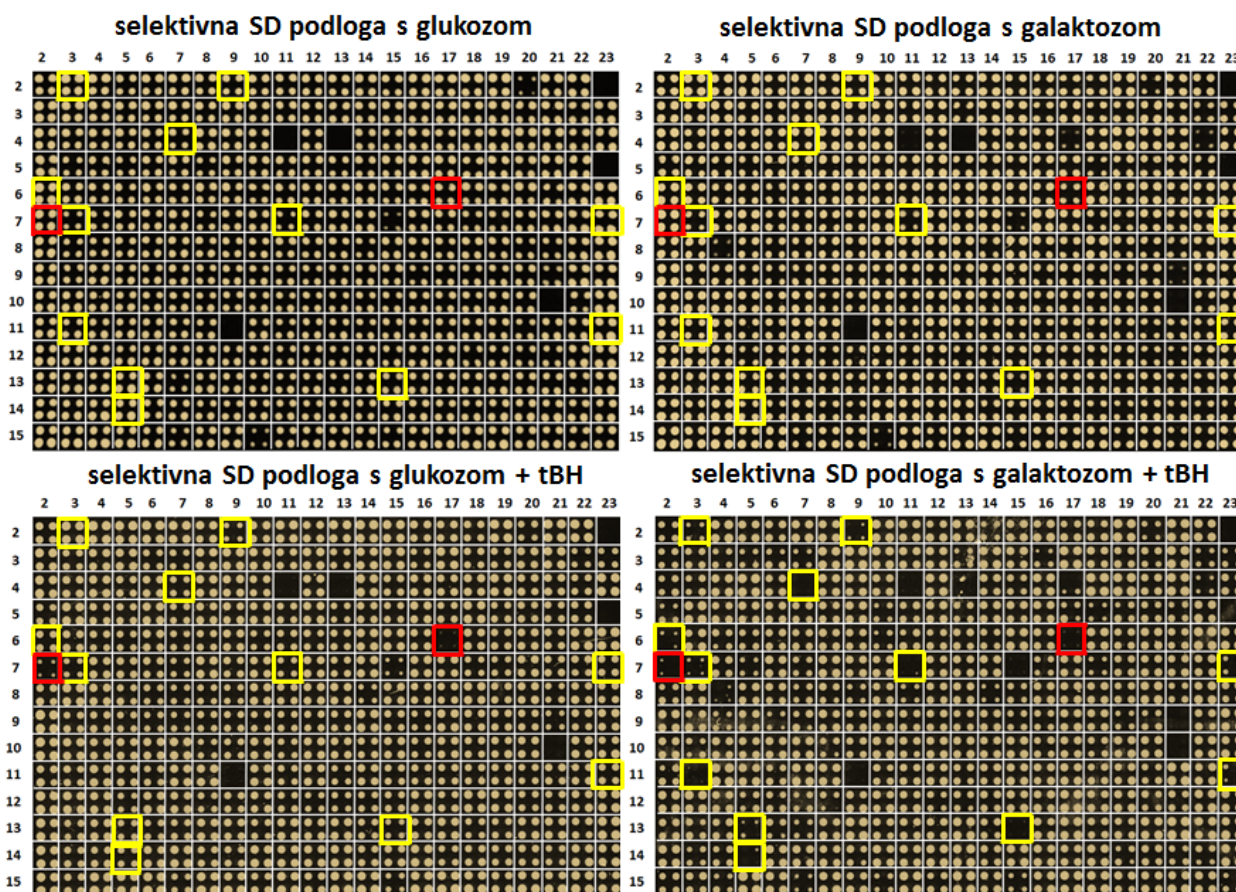
geni	K1
COQ2, CAT5, SWS2, COX17, CYT1, AEP2, HMI1, ATP11, PET122, COX10, GAL10, RIM1, GSH1, GAL7, YLR218C, COX7, BCS1, GAL4	0
GAL3, QCR2, GAL1, YOL008W, HTD2, PTH1, COX23	0,1
COX12, RPL8A, YBR020W, RPL19B, PGM2, GAL2, CBT1	0,2
GON5, GSF2, YOR135C, TKL1, NHP10, SIN4, EAP1, GSH2, DST1, COX14	0,3
YLL014W, OAR1, YOR186W, GYP1, YDJ1, CEM1, RIM8, YIL151C	0,4
NCE102, MED1, BRE1, SHG1, RPL43A, YGL046W, ARO1, BRE1, YNL170W, CTK1, SLX8, PHO80, BUL1, SWF1, ERG3, YDR290W, FUM1, TPS2, LGE1, WHI2, YPR044C, NDI1, QCR9, MET16, RVS167, VPS27, YRA2, RTT103	0,5

Tablica 9. Popis 78 „dvostrukih“ mutanata, koji su pokazali najjaču inhibiciju rasta na podlozi s galaktozom, svrstanih u grupe prema staničnim procesima. Prikazani su samo geni čija je učestalost unutar grupe ovisno o procesu, bila povišena u odnosu na učestalost gena koji su uključeni u taj proces na razini genoma.

Procesi prema bazi kvasca “GO-Slim Mapper”	Udio unutar grupe	Udio unutar genoma	Geni svrstani prema pojedinim procesima kvasca
organizacija mitohondrija	21,1%	5,4%	AEP2, ATP11, BCS1, BUL1, COA4, COX12, COX14, COX1, COX23, HMI1, PET122, PTH1, RIM1, RTC6, SWS2, YDJ1
biogeneza proteinskih kompleksa	13,2%	4%	ATP11, BCS1, CBT1, COA4, COX12, COX14, COX17, COX23, DST1, PET122
metabolizam ugljikovodika	11,8%	4,2%	GAL1, GAL10, GAL2, GAL3, GAL4, GAL7, PGM2, TKL1, TPS2
stvaranje metaboličkih prekursora i energije	11,8%	2,5%	COQ10, COX7, CYT1, FUM1, NDI1, OAR1, PGM2, QCR2, QCR9
transkripcija s promotora RNA polimeraze II	11,8%	7,2%	BRE1, CTK1, DST1, GAL3, GAL4, IRC14, MED1, PHO80, SIN4
stanično disanje	10,5%	1,4%	COQ10, COX7, CYT1, FUM1, NDI1, OAR1, QCR2, QCR9
mitohondrijska translacija	7,9%	2,2%	AEP2, COX14, PET122, PTH1, RTC6, SWS2
kofaktori metaboličkih procesa	7,9%	2,1%	CAT5, COQ10, COQ2, COX10, NDI1, TKL1
procesiranje mRNA	5,3%	3,0%	CBT1, CTK1, DST1, RTT103
modifikacija proteina uklanjanjem ili konjugacijom malih proteina	5,3%	2,4%	BRE1, BUL1, LGE1, SLX8
regulacija translacije	5,3%	1,4%	COX14, CTK1, EAP1, PET122

3.4.1. SGA – oksidacijski stres

Nadalje, kako bi se identificirali geni koji su uključeni u stanične odgovore tijekom oksidacijskog stresa, u prisutnosti PUFA, „dvostruki“ mutanti uzgajani na podlozi s galaktozom, presađeni su na podlogu s galaktozom i tBH. Kao kontrola, „dvostruki“ mutanti uzgajani na podlozi s glukozom nasađeni su na podlogu s glukozom i tBH (slika 47).



Slika 47. Primjer rasta „dvostrukih“ mutanata dobivenih metodom SGA nakon zadnjeg koraka selekcije na selektivnoj SD podlozi s glukozom (gore lijevo), galaktozom (gore desno), glukozom s tBH (dolje lijevo) i galaktozom s tBH (dolje desno). Prikazani su sojevi s pločice 6/14, a žutim kvadratićem, kao primjer, označeni su sojevi koji su pokazali snažnu inhibiciju rasta u prisutnosti PUFA u uvjetima oksidacijskog stresa. Crvenim kvadratićem označeni su sojevi koji su pokazali snažnu inhibiciju rasta neovisno o prisutnosti PUFA u uvjetima oksidacijskog stresa,.

Za početak, identificirani su mutanti, koji su pokazali osjetljivost na oksidacijski stres na podlozi s glukozom, neovisno o prisutnosti PUFA, (tablica 10). Na ovaj način izdvojeno je 66 mutanata, koji su pokazali barem 50%-tni zastoj u rastu na podlozi s tBH, te su grupirani prema staničnim procesima (tablica 11).

Tablica 10. Popis 66 identificiranih „dvostrukih“ mutanata (gena) koji su pokazali najjači inhibitorni učinak u rastu na podlozi s glukozom i tBH. Budući glukoza inhibira ekspresiju $\Delta 12$ desaturaze, na ovaj način identificirani su jednostruki mutanti osjetljivi na oksidacijski stres, neovisno o prisutnosti PUFA. Geni su poredani prema koeficijentu (K2) koji označava jačinu inhibicije rasta, s time da 0 označava potpuni zastoj rasta u funkcionalnim jednostrukim mutantima bez navedenog gena.

geni	K2
YAP1, BST1, ERG6, CSN12, ROM2, SKN7, ARG4, YBP1, HYR1	0
PER1, LEM3, RVS167, MET32, TRX2, AHP1	0,1
MBP1, ERG3, YDL176W, GUP1, TEF4	0,2
ERG2, TAH1, EAP1, FAB1	0,3
VAM10, NKP2, SGF29, SNC2, BUD31, VPS27, YNL013C, BEM4, ISC1, SRX1, PHO80, PUF6, YJL120W, GCV1, YPR050C, TCI1, SRO9, IRA2	0,4
YIL067C, RPL19B, RPL9B, VPS35, ALT1, DRS2, RAV2, PHO86, YBR025C, GTR2, SIC1, YBR285W, PAK1, STB5, VCX1, PSR1, RPS28A, DST1, YDL099W, YNL296W, ERG5, TOF2, YDL119C, YLL007C	0,5

Tablica 11. Popis 66 „dvostrukih“ mutanata, koji su pokazali najjaču inhibiciju rasta na podlozi s glukozom i tBH, svrstanih u grupe prema staničnim procesima. Prikazani su samo geni čija je učestalost unutar grupe ovisno o procesu, bila povišena u odnosu na učestalost gena koji su uključeni u taj proces na razini genoma.

Procesi prema bazi kvasca “GO-Slim Mapper”	Udio unutar grupe	Udio unutar genoma	Geni svrstani prema pojedinim procesima kvasca
transkripcija s promotora RNA polimeraze II	15,2%	7,2%	DST1, GTR2, MBP1, MET32, PHO80, SGF29, SKN7, STB5, YAP1, YNL296W
odgovor na kemijske podražaje	13,6%	5,7%	AHP1, HYR1, SKN7, SRX1, STB5, TRX2, YAP1, YBP1, YJR084W
metabolizam lipida	13,6%	4,3%	BST1, ERG2, ERG3, ERG5, ERG6, FAB1, GUP1, ISC1, PER1
odgovor na oksidacijski stres	12,1%	1,4%	AHP1, HYR1, SKN7, SRX1, STB5, TRX2, YAP1, YBP1
vezikularni transport Golgijevog aparata	9,1%	3,0%	BST1, BUG1, DRS2, PHO86, SNC2, TRX2
signalni putovi	9,1%	3,6%	BEM4, IRA2, LEM3, PHO80, ROM2, YJR084W
stanični metabolizam amino kiselina	6,1%	3,8%	ALT1, ARG4, GCV1, MET32
stanična homeostaza iona	6,1%	1,9%	PER1, PHO80, RAV2, VCX1
mitotski stanični ciklus	6,1%	4,6%	MBP1, MET32, SIC1, TOF2
ctoplazmatska translacija	6,1%	2,7%	RPL19B, RPL9B, RPS28A, SRO9
endocitoza	6,1%	1,6%	DRS2, ROM2, RVS167, SNC2
fosforilacija proteina	4,5%	2,8%	PHO80, SAK1, SIC1
fuzija membrana	4,5%	1,2%	SNC2, TRX2, VAM10
lipidacija proteina	3,0%	0,7%	GUP1, PER1
transport lipida	3,0%	0,8%	DRS2, LEM3

Kao što se očekivalo, puno više mutanata pokazalo je osjetljivost na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA. Za procjenu osjetljivosti sojeva na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA u obzir su uzeti samo mutanti koji su imali sljedeće: koeficijent rasta na galaktozi veći od 50% ($K1 > 0,5$), koeficijent rasta na galaktozi i tBH manji od 50% ($K3 < 0,5$) i koeficijent rasta na glukozi i tBH veći ili jednak 100% ($K2 \geq 1$). Također, u obzir su uzeti i mutanti koji su pokazali manji zastoj u rastu na podlozi s glukozom i tBH ($K2 \geq 0,7$), ali su pokazali puno veću osjetljivost u prisutnosti PUFA ($K3 < 0,2$). Na ovaj način, identificirano je 217 jednostrukih mutanata, koji su u prisutnosti PUFA i uvjetima oksidacijskog stresa pokazali koeficijent inhibicije rasta veći od 50% u odnosu na kontrolu ($K4 < 0,5$), te su prikazani u tablici 12. Kao i prethodno identificirani geni su grupirani prema procesima (tablica 13.)

Tablica 12. Popis 217 identificiranih „dvostrukih“ mutanata (gena) koji su pokazali najjači inhibični učinak u rastu u uvjetima oksidacijskog stresa, ovisno o prisutnosti PUFA. Geni su poredani prema koeficijentu ($K4$) koji označava jačinu inhibicije rasta „dvostrukih“ mutanata na podlozi s galaktozom i tBH u odnosu na njihovu inhibiciju rasta na podlozi s glukozom i tBH. Nulom (0) su označeni sojevi koji su pokazali potpuni zastoj rasta.

geni	$K4$
IRA2, TPS2, MCK1, YMR155W, ERP4, VPS8, ODC2, CAF120, HIR2, YOL046C, YNR004W, BSD2, MET18, FYV12, YCR095C, TCO89, RIM15, RCY1, DNF1, SRB8, YPL062W, RHO5, YDL086W, FMP22, PEP8, SRL3	0
SPT3, VPS29, SRO7, SSD1, KTR1, YOR051C, FEN1, CMP2, YOL085C, YDR336W, PKH3, YPT35, CSI1, RAS2, VPS24, YGR273C, ACS1, INH1, GIS2, FCY1, TFP1, ATX1, GPB2	0,1
YMR258C, RPL16B, BUD3, DAP2, ILM1, YDR317W, YKU70, MGA2, PHO87, SRO9, ZWF1, RSN1, YOR024W, YKR035C, JJJ1, YCL002C, YMR244W, YEL043W, NPR1, TRM7, NUP133, GPA2, YMD8, MUP1, TIR4, RPE1, YMR278W, RAD59, ECM29, YML122C, SPS4	0,2
ATH1, KEX1, YMR147W, NGL1, YDR274C, HPC2, YPL158C, IBD2, YLR404W, LYS20, RPA34, YPL102C, TOM70, ICY2, YKL171W, CKB1, DID2, SNF11, YOR366W, DLS1, DNL4, YDL237W, ATR1, ELA1, HBS1, YOR111W, FMP12, YAK1, MKK2, FES1, YOL003C, LAG1, PCL1, YMR130W, MUD1, YCR023C, RAS1, IMA5, BRE1, YHL044W, PAC11, SVP26, YJL171C, ASP1, GRD19, CCC1, YER188W	0,3
YEL028W, GRX1, SVF1, CRH1, AVT2, PDR11, GLR1, FTR1, YJR107W, XBP1, SRB2, FMP45, HAL1, ELP3, KHA1, MSN2, SWP82, FMP42, TUL1, DIN7, YBL083C, YEL033W, YIR042C, ECM39, CDC73, YBR075W, CAD1, MDG1, GLK1, IZH1, ELM1, RPS16A, DPH1, EOS1, YBR032W, RAV1, YDJ1, YML131W, TSR2, SEL1, YNL285W, MAK32, YNL303W, YCR025C, YPT10	0,4
TSA2, KES1, EAF6, ELP6, GLC8, YMR102C, POL4, APT2, MNN2, THI7, YDL177C, YFL019C, PRD1, PMT5, YBR209W, YGL217C, ELP2, FUI1, YDL026W, YOR338W, CHS1, YLR444C, NRP1, LAS21, YHR049C-A, TDP1, BUD27, SAP30, MAG1, MXR2, ATS1, OCA1, NRG2, RCF2, YMR086W, GLT1, YDR431W, RBF18, BEM2, FET3, MUS81, VPS74, SBP1, AIM2	0,5

Tablica 13. Popis 217 „dvostrukih“ mutanata, koji su pokazali najjaču inhibiciju rasta na podlozi s galaktozom i tBH, svrstanih u grupe prema staničnim procesima. Prikazani su samo geni čija je učestalost unutar grupe ovisno o procesu, bila povišena u odnosu na učestalost gena koji su uključeni u taj proces na razini genoma.

Procesi prema bazi kvasca “GO-Slim Mapper”	Udio unutar grupe	Udio unutar genoma	Geni svrstani prema pojedinim procesima kvasca
nepoznati biološki proces	26,6%	18,6%	AIM17, AIM18, AIM2, AIM44, AIM6, APT2, FYV12, MTC7, NGL1, NRP1, OCA4, OPI8, PGM3, SEG1, SWM2, TIR4, YBL083C, YBR032W, YBR209W, YCL002C, YCR023C, YCR025C, YDL026W, YDL086W, YDL177C, YDR274C, YDR336W, YDR431W, YEL028W, YEL043W, YER188W, YFL019C, YGL217C, YGR273C, YHL044W, YHR049C-A, YIR042C, YJL171C, YJR107W, YLR444C, YML122C, YML131W, YMR102C, YMR130W, YMR147W, YMR155W, YMR221C, YMR244W, YNL285W, YNL303W, YOL046C, YOL085C, YOR024W, YOR111W, YOR366W, YPLO62W, YPL102C, YPT35
odgovor na kemijske podražaje	13,8%	5,7%	ATR1, ATX1, CAD1, CMP2, CSI1, ELM1, EOS1, FET3, GLR1, GPA2, GPB2, GRX1, IZH1, MDG1, MGA2, MSN2, MXR2, NRG2, OCA1, RAS2, RIM15, SRB2, SRB8, SVF1, TH17, TMA19, TSA2, VPS74, ZWF1
transkripcija s promotora RNA polimeraze II	10,1%	7,2%	BRE1, CAD1, CAF120, CDC73, ELP2, ELP3, ELP6, GPB2, HAL1, HIR2, HPC2, MGA2, MSN2, NRG2, NUP133, SAP30, SNF11, SPT3, SRB2, SRB8, SWP82, YOR338W
metabolizam ugljikovodika	7,3%	4,2%	ALG12, ATH1, CRH1, ELM1, EOS1, GLC8, GLK1, IMA5, KTR1, MNN2, PMT5, RPE1, SVP26, TCO89, TPS2, ZWF1
signalni putovi	7,3%	3,6%	BEM2, CMP2, CSI1, GPA2, GPB2, IRA2, MDG1, MKK2, PKH3, RAS1, RAS2, RHO5, SRO7, TCO89, VPS74
odgovor na oštećenja DNA	6,9%	4,5%	BRE1, CDC73, CKB1, DIN7, DNL4, EAF6, HIM1, MAG1, MCK1, MUS81, NUP133, POL4, RAD59, TDP1, YKU70
popravak DNA	6,4%	3,8%	BRE1, CDC73, DIN7, DNL4, EAF6, HIM1, MAG1, MCK1, MUS81, NUP133, POL4, RAD59, TDP1, YKU70
odgovor na oksidacijski stres	6,0%	1,4%	ATX1, EOS1, GLR1, GRX1, MSN2, MXR2, OCA1, RIM15, SVF1, TMA19, TSA2, ZWF1
fosforilacija proteina	5,0%	2,8%	CDC73, CKB1, ELM1, MCK1, MKK2, NNK1, NPR1, PCL1, PKH3, RIM15, YAK1
transport iona	4,6%	3,3%	ATR1, ATX1, BSD2, CCC1, FET3, FTR1, KHA1, MUP1, PHO87, YMD8
endosomalni transport	3,7%	1,2%	DID2, PEP8, RAV1, RY1, SNX3, VPS24, VPS29, VPS8
stanična homeostaza iona	3,7%	1,9%	ATX1, CCC1, CMP2, FET3, FTR1, IZH1, RAV1, VMA1
sporulacija	3,7%	2,0%	FMP45, GPA2, GPB2, MCK1, RAS2, SPS4, SPT3, YOR338W
glikolizacija proteina	2,8%	1,0%	ALG12, EOS1, KTR1, MNN2, PMT5, SVP26

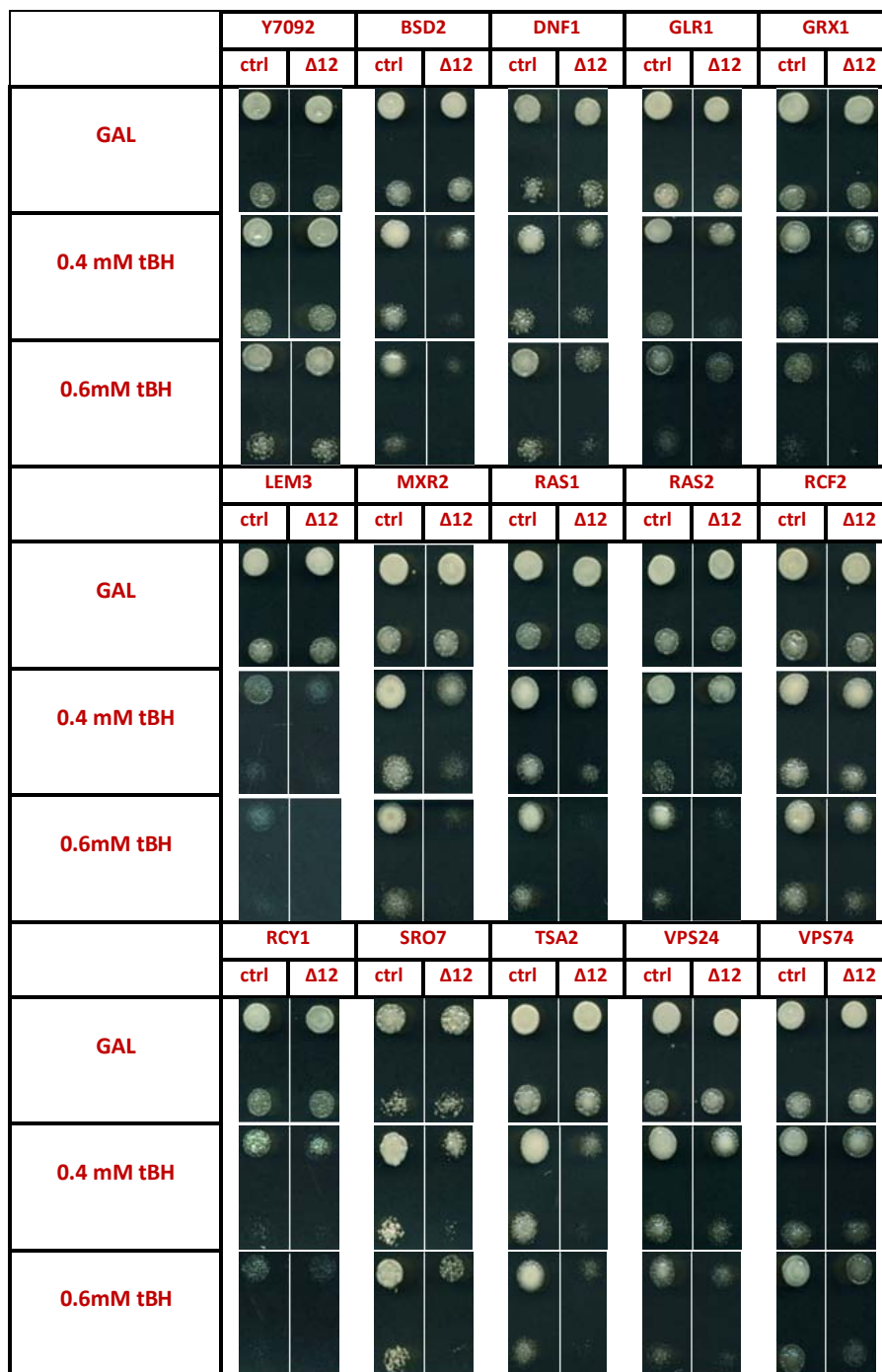
3.4.1.1. Potvrda mutanata osjetljivih na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA

U nastavku istraživanja cilj je bio potvrditi rezultate dobivene metodom SGA. Iz grupe od 217 „dvostrukih“ mutanata, koji su u prisutnosti PUFA pokazali osjetljivost na oksidacijski stres, izabrano je 14 sojeva za dodatne analize (tablica 14). Kako bi se eliminirala mogućnost zamjene sojeva, kojoj su podložne ovakve velike kolekcije sojeva, napravljena je potvrda izabranih sojeva metodom PCR na kolonijama. Za potvrdu povećane osjetljivosti izabranih mutanata na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA, napravljen je test na pločama s tBH, a kao kontrola korišteni su jednostruki mutanti iz originalne kolekcije. Prijašnjim radom pokazano da trajna prisutnost PUFA (drugi i treći dan od početka indukcije $\Delta 12$ desaturaze) u divljem tipu (BYdesa) uzrokuje adaptivne promjene koje dovode do rezistencije na egzogeni oksidacijski stres [178]. Kako bi se potvrdilo da prisutnost PUFA u dobivenim mutantima uzrokuje povećanu osjetljivost na egzogeni oksidacijski stres i nakon perioda u kojem dolazi do adaptacije, svi sojevi uzgajani su dva dana na krutim SD podlogama s galaktozom, nakon čega su sojevi inokulirani u tekući SD medij s galaktozom. Stanice iz logaritamske faze rasta nasadene su u dvije gustoće (OD_{600} 0,5 i 1,0) na krute SD podloge s galaktozom i galaktozom s tBH (0,4 i 0,6 mM). Iz slike 48 vidljivo je da je prisutnost PUFA utjecala na povećanu osjetljivost ovih mutanata na oksidacijski stres, premda postoje razlike u inhibiciji rasta ovisno o soju te koncentraciji tBH. Nadalje, soj Y7092desa u prisutnosti PUFA nije pokazao povećanu osjetljivost na tretman s tBH u odnosu na svoju kontrolu (Y7092), što je u skladu s prijašnjim rezultatima. Na ovaj način potvrđena je važna uloga identificiranih gena u staničnom odgovoru na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA.

Tablica 14. Od 217 jednostrukih mutanata koji su pokazali povećanu osjetljivost u uvjetima oksidacijskog stresa u prisutnosti PUFA za dodatnu analizu i potvrdu osjetljivosti izabrano je 14 sojeva.

GEN	OPIS
BSD2	Protein zadužen za održavanje homeostaze iona metala, posreduje u prijenosu metalnih transportera Smf1 i Smf2 u vakuolu, gdje bivaju razgrađeni; kontrolira transport iona metala, sprječava hiperakumulaciju metala i sudjeluje u detoksifikaciji bakra.
DNF1	Aminofosfolipidna translokaza (flipaza), lokalizirana primarno u plazma membrani; pridonosi procesu endocitoze, transportu proteina i polarnosti stanice; spada u u P4 potporodicu P-tip ATP-aza.

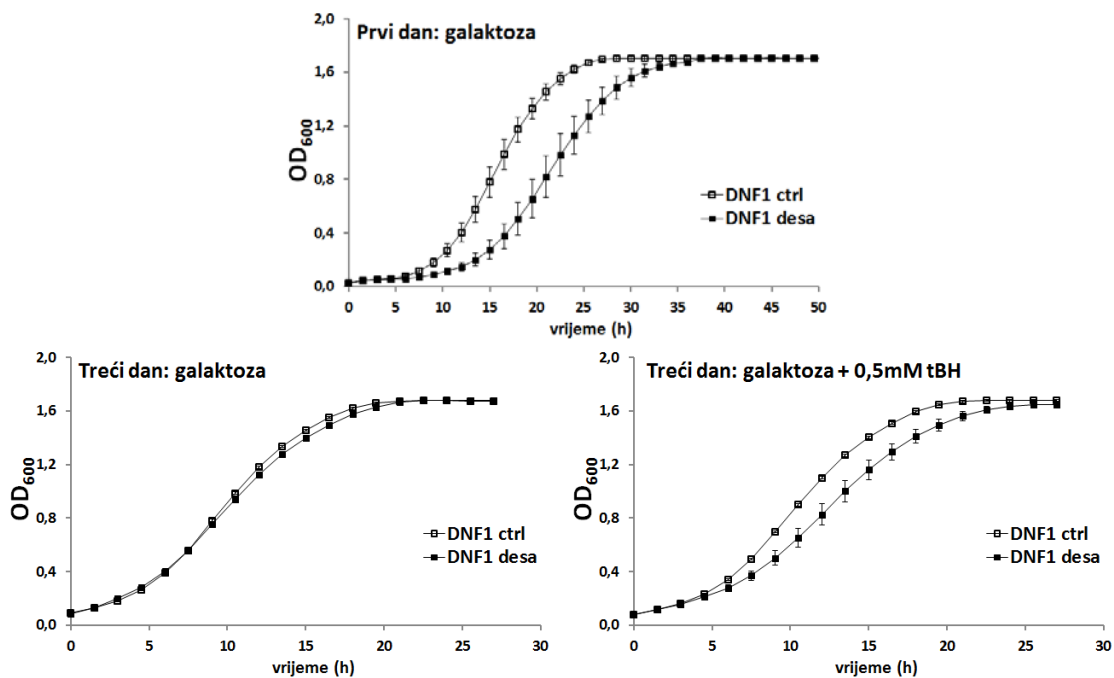
GLR1	Citoplazmatska i mitohondrijska glutation oksidoreduktaza: zadužena za konverziju oksidiranog glutationa u reducirani glutation; mitohondrijska, ali ne i citoplazmatska forma ima ulogu u rezistenciji na hiperoksiju; količina proteina se povećava prilikom odgovora na stres uzrokovan replikacijom DNA
GRX1	Glutation-ovisna disulfid oksidoreduktaza; javlja se u odgovoru na prisutnost vodikovog peroksida i superoksidnog radikala, otporna na toplinu, sa parom cisteina na aktivnom mjestu; zaštita stanice od oksidacijskih oštećenja; ima paralog GRX2, nastao duplikacijom genoma; količina proteina se povećava prilikom odgovora na stres uzrokovan replikacijom DNA
LEM3	Membranski protein plazma membrane i ER-a, djeluje specifično <i>in vivo</i> sa fosfolipidnom translokazom (flipazom) Dnfl; uključena u translokaciju fosfolipida i alkilfosfolinskih lijekova preko plazma membrane.
MXR2	Metionin-R-sulfoksid reduktaza, uključena u odgovor na oksidacijski stres; štiti želježno-sumporne klastere od oksidacijske inaktivacije u tandemu sa proteinom Mxr1; uloga u regulaciji životnog vijeka
RAS1	GTP-aza, uključena u signalne putove G-proteina u aktivaciji adenilat ciklaze; ima ulogu u proliferaciji stanica; lokalizirana u plazma membrani; homolog onkogene RAS kod sisavaca; relativna distribucija u jezgri se povećava prilikom stresa uzrokovanog replikacijom DNA
RAS2	GTP-vezujući protein koji regulira odgovor prilikom nedostatka dušika, sporulaciju i filamentozni rast; farnesilacija i palmitoilacija potrebni za aktivnost i lokalizaciju u plazma membrani; homolog Ras proto-onkogene kod sisavaca
RCF2	Podjedinica citokrom c oksidaze; ima ulogu u stvaranju respiratornih superkompleksa; sličan proteinu Rcf1, s time da je samo jedan dovoljan za kasnije korake sklapanja Cox12 i Cox13 podjedinica i aktivnost citokrom c oksidaze; povezana sa citokrom c oksidazom – citokrom bc1 superkompleksom: mutant akumulira ROS; član konzervirane porodice gena uključene u odgovor na hipoksiju
RCY1	Protein F-kutije uključen u recikliranje proteina plazma membrane unesenih u procesu endocitoze; lokalizacija u mjestima polariziranog rasta
SRO7	Efektor Rab GTP-aze Sec4; stvara kompleks sa Sec4p i t-SNARE Sec9; uključen u egzocitozu, usmjeravanje i fuziju post Golgijevih vezikula s plazma membranom; homolog tumor supresora Igl kod Drosophile; ima paralog SRO77, koji je nastao duplikacijom cijelog genoma
TSA2	Citoplazmatska tioredoksin peroksidaza inducirana stresom; zajedno s proteinom Tsa1 uklanja reaktivne kisikove, dušikove i sumporne vrste koristeći tioredoksin kao donor vodika; delecija pospješuje mutatorski fenotip <i>tsa1</i> mutanata; količina proteina se povećava prilikom odgovora na stres uzrokovan replikacijom DNA
VPS24	Jedna od podjedinica endosomalnog kompleksa za sortiranje, potrebna za transport III (ESCRT-III); stvara ESCRT-III podkompleks s proteinom Did4; uključen u putove sortiranja transmembranskih proteina u multivezikularna tijela (eng. multivesicular bodies)
VPS74	Efektor Golgijeve fosfatidilinositol-4-kinaza i senzor PtdIns4P; uključen u interakciju sa citoplazmatskom domenom cis i medijalne glikoziltransferaze i posreduje u ciljanju ovih proteina u Golgijev aparat putem svoje PtdIns4P vezane forme; u interakciji je s katalitičkom domenom proteina Sac1, vodeće stanične PtdIns4P fosfataze, koja kontrolira defosforilaciju i ukupan trust Golgijevog PtdIns4P; funkcionalan kao tetramer; ortolog ljudskom GOLPH3/GPP34/GMx33



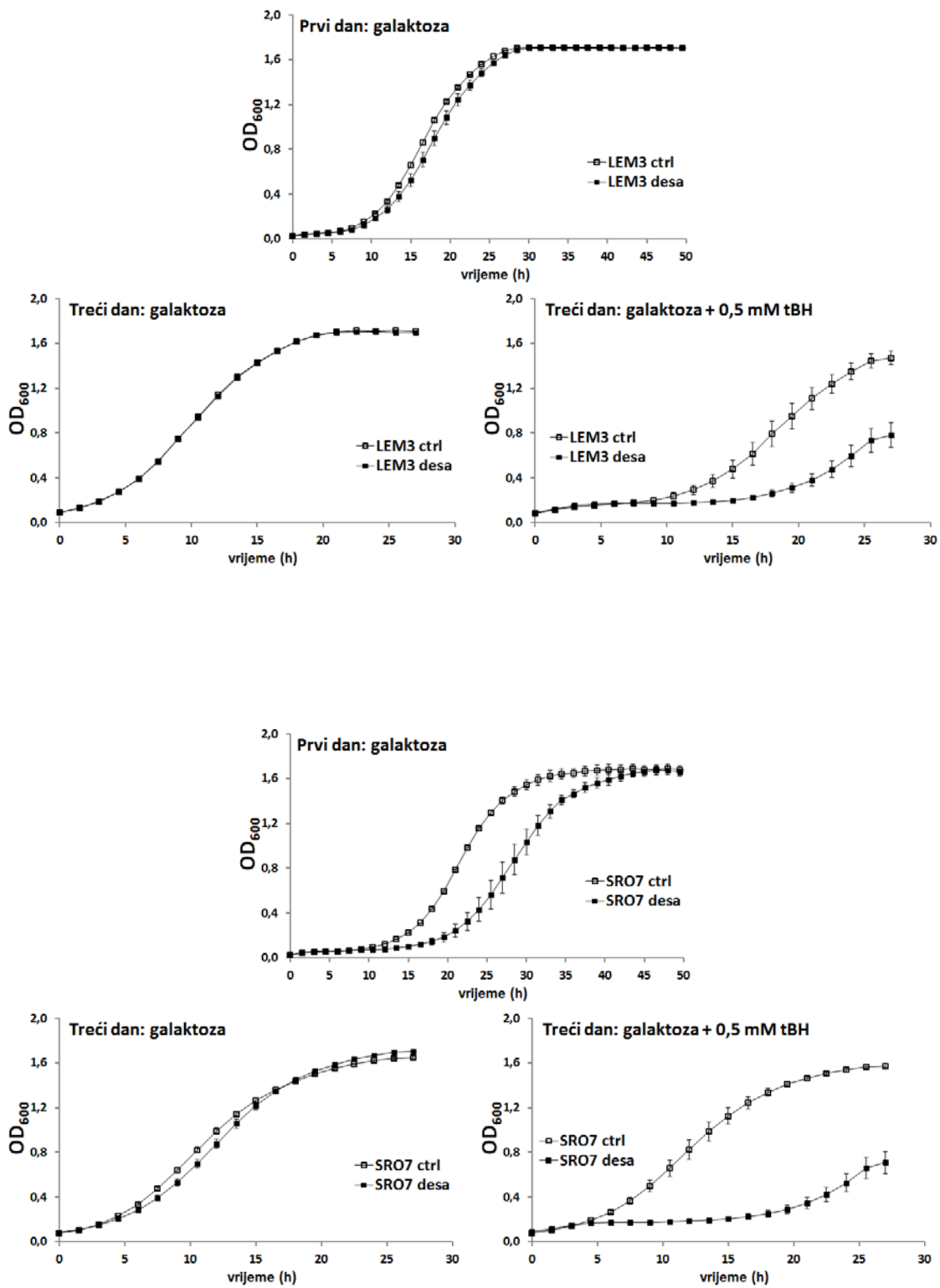
Slika 48. 14 izabranih sojeva (od 217), dobivenih metodom SGA, koji su pokazali povećanu osjetljivost u uvjetima oksidacijskog stresa u prisutnosti PUFA. Izuzetak je soj *lem3*, koji je pokazao povećanu osjetljivost i na podlozi s glukozom i s galaktozom. Kao kontrola korišteni su sojevi Y7092 i Y7092desa.

Nadalje, iako izabrani mutanti nisu pokazali razlike u rastu u prisutnosti PUFA na agaroznim pločama s galaktozom, primijećeno je da je u tekućem mediju s galaktozom došlo do zastoja rasta pojedinih mutanata ovisno o prisutnosti PUFA. Kako bi se bolje

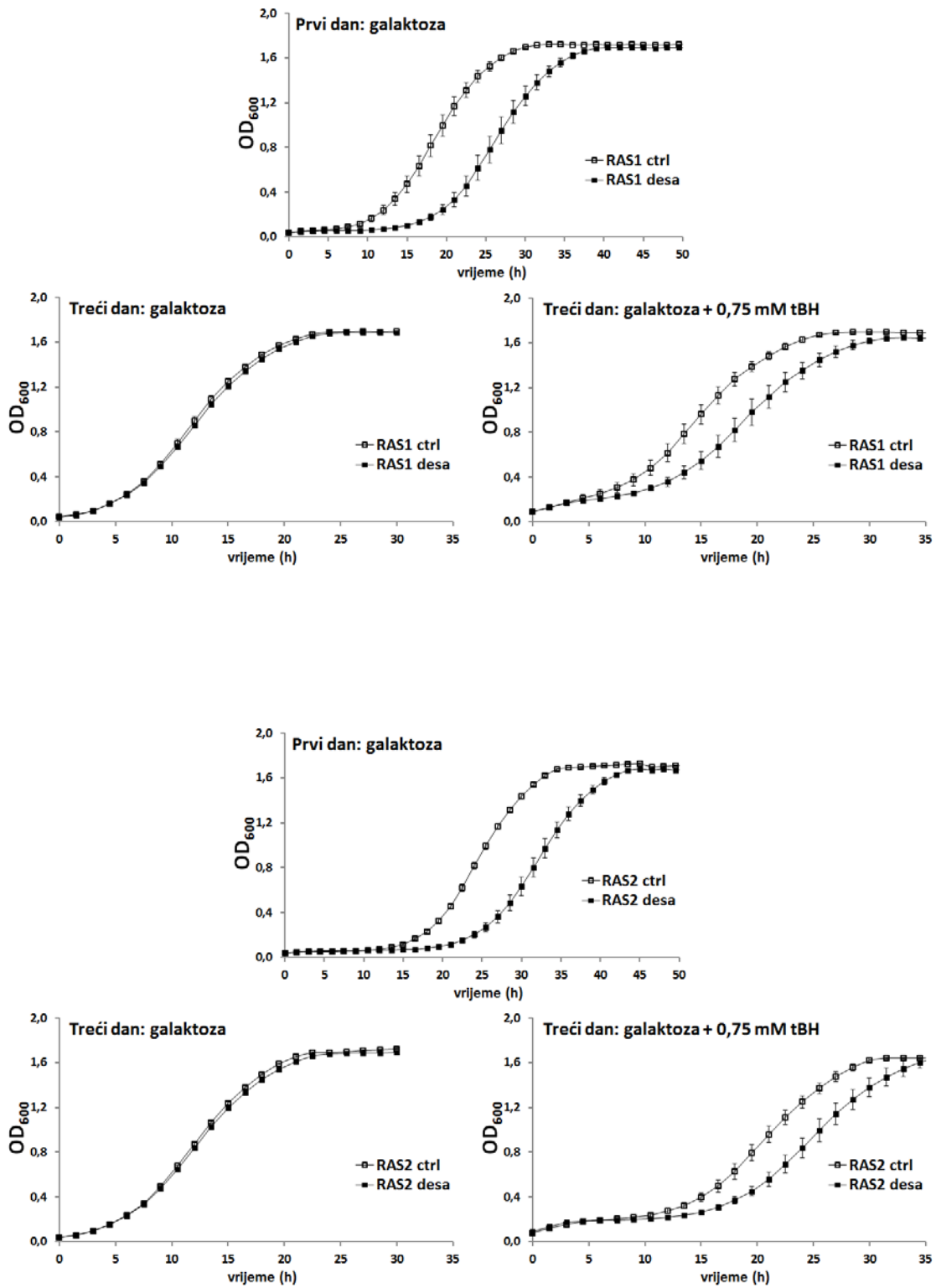
okarakterizirao utjecaj PUFA na rast ovih mutanata, praćen je njihov rast do 50h nakon početka indukcije $\Delta 12$ desaturaze (slika 49). Paralelno, stanice su uzgajane 48h u tekućem SD mediju s galaktozom, do stacionarne faze, kako bi se stanicama omogućila prilagodba na prisutnost PUFA. Zatim, stanice su razrijeđene, te je praćen rast sojeva u mediju s galaktozom i mediju s galaktozom i tBH (slika 49). Izuzev soja *lem3desa*, koji je u prisutnosti PUFA pokazao tek manji zaostatak u rastu u vremenu nakon inicijalne indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu, ostali sojevi u prisutnosti PUFA pokazali su značajnu inhibiciju rasta. Ovakav rezultat upućuje na ulogu gena *RAS1*, *RAS2*, *DNF1*, *BSD2* i *SRO7* u inicijalnom procesu adaptacije na prisutnost PUFA, neovisno o egzogenom oksidacijskom stresu. Kao što je vidljivo iz krivulje rasta koja je mjerena nakon perioda adaptacije (treći dan), nije bilo značajne razlike u rastu sojeva sa i bez PUFA. Međutim, svi mutanti pokazali su povećanu osjetljivost na tretman tBH, što je potvrdilo važnu ulogu identificiranih gena u odgovoru stanica kvasca na oksidacijska oštećenja u prisutnosti PUFA.



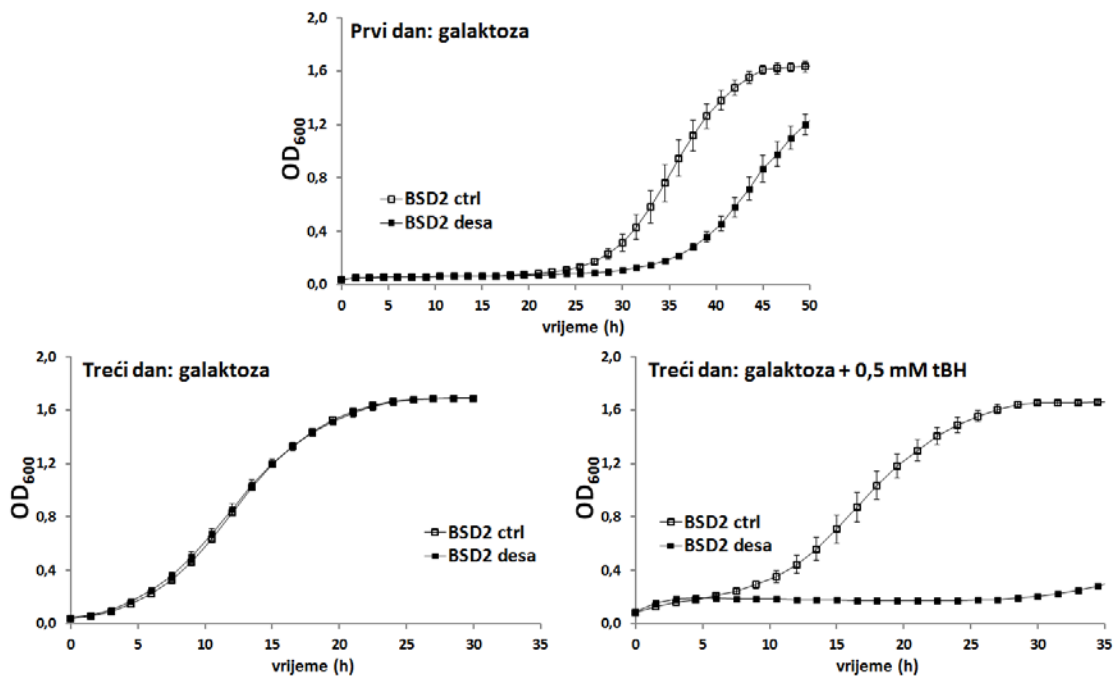
Slika 49. Prikazana je usporedba krivulje rasta jednostrukih mutanata sa i bez kromosomski ugrađenog gena za $\Delta 12$ desaturazu, tijekom inicijalne indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu u mediju sa galaktozom (gore) i nakon 48 sati u prisutnosti PUFA (dolje lijevo). Također, sojevi koji su 48 sati bili izloženi prisutnosti PUFA tretirani su s tBH, te je zatim praćen zastoje u rastu stanica (dolje desno). Krivulje rasta ostalih 5 sojeva prikazani su na iduće tri stranice.



Slika 49. Nastavak.



Slika 49. Nastavak.



Slika 49. Nastavak.

Prva zaštita stanice od negativnih utjecaja okoliša je barijera, odnosno njena membrana. Membranski sustavi metabolički su najaktivnija mjesta u stanici, budući su odgovorni za esencijalne stanične procese poput selektivne propusnosti, prijenosa signala, održavanja ionskih gradijenata, sinteze i transporta proteina i lipida, proizvodnje energije (ATP), te procesa endocitoze i egzocitoze [1]. U sastav membranskih lipida ulaze PUFA, koje su zastupljene u svim domenama živog svijeta od protista do odvedenijih eukariotskih organizama poput čovjeka [11]. PUFA imaju važnu ulogu u moduliranju fizikalnih svojstava bioloških membrana, budući upravo njihova prisutnost pozitivno utječe na svojstva poput propusnosti i negativne zakrivljenosti membrane, kompresibilnosti lipida, te stvaranja heterogenih membranskih domena s različitim stupnjem uređenosti [26, 42]. U odnosu na zasićene ili jednostruko nezasićene masne kiseline, PUFA pokazuju povećanu konformacijsku slobodu koja je važna za interakciju s membranskim proteinima, te posljedično tome i njihovu funkciju. Uvođenje negativne zakrivljenosti u membrane važno je za sve procese u kojima dolazi do odvajanja membranskih sustava ili fuzije membrana poput diobe stanica, te procesa endocitoze i egzocitoze. Osim toga, PUFA i njihovi metaboliti djeluju i kao signalne molekule, te imaju važnu ulogu u transkripcijskoj aktivaciji pojedinih gena [2, 54]. Posljedično širokom spektru biološki važnih uloga koje PUFA imaju u regulaciji esencijalnih membranskih procesa, u svrhu očuvanja integriteta bioloških membrana i stanične homeostaze u stanici postoji sustav regulacije sastava masnih kiselina u membranskim lipidima. Ovisno o vanjskim podražajima i trenutnim potrebama, stanica može značajno varirati sastav masnih kiselina i PUFA, što je do sada možda najbolje opisano na primjeru poiklotermnih organizama, prilikom njihove adaptacije na promjene temperature životnog okoliša [15, 26]. Kod svih eukariotskih organizama stupanj nezasićenosti membranskih lipida reguliran je na sličnom principu, mehanizmom povratne sprege, prilikom čega dolazi do povećanja ili snižavanja količine unutarstaničnih desaturaza, ovisno o potrebama stanice za proizvodnjom (P)UFA [58]. Osim toga, važnu ulogu u regulaciji stupnja nezasićenosti bioloških membrana ima proces remodeliranja membranskih lipida, Landov ciklus, prilikom kojeg dolazi do procesa deacilacije i reacilacije membranskih lipida [46]. Međutim, unatoč opsežnim spoznajama o brojnim ulogama pojedinih vrsta PUFA na membranske procese te poznatim putovima regulacije stupnja nezasićenosti membranskih sustava, mehanizmi kojima stanica regulira točno određeni sastav PUFA na razini stanice u lipidnim razredima i membranskim sustavima nisu ni približno razjašnjeni.

S biomedicinskog stajališta PUFA su postale važan segment znanstvenih istraživanja, budući da je patofiziologija mnogih bolesti povezana s aberantnim metabolizmom PUFA [7, 8, 40, 115, 124, 182]. U posljednjih dvadesetak godina, puno pažnje posvećeno je istraživanjima uloge oksidacijskih oštećenja PUFA u brojnim patofiziološkim stanjima. uzrokovanih procesima lipidne peroksidacije [5, 8, 9]. Lipidna peroksidacija rezultira narušavanjem integriteta bioloških membrana, te može dovesti do stvaranja reaktivnih aldehida kao potencijalno štetnih krajnjih produkata razgradnje PUFA [8]. Nadalje, lipidna peroksidacija jedan je od najvažnijih čimbenika u procesu starenja, što je također u skladu s znanstvenom teorijom prema kojoj je oksidacijski stres jedan od glavnih uzroka starenja organizma [1, 6, 183]. Jedan od svakako najzanimljivijih aspekata problematike metabolizma PUFA odnosi se na njihovu ulogu u tumorogenezi, a povezan je s poremećajem ravnoteže sastava ω -3 i ω -6 PUFA prema ω -6 PUFA, koje se smatraju prokancerogenim [184, 185]. Nadalje, poznato je da tumorske stanice imaju promijenjen sastav masnih kiselina, koji je većinom reguliran *de novo* sintezom unutar tumorskih stanica, a karakterizira ga smanjeni udio nezasićenih masnih kiselina, odnosno povećanje stupnja zasićenosti membranskih lipida. Neki autori ovakve promjene povezuju s zaštitnim mehanizmom kojima se stanice tumora štite od potencijalnih oksidacijskih oštećenja PUFA, do kojih može doći u slučaju povećanog stupnja desaturacije [186].

Za razliku od većine eukariotskih organizama, kvascu su za normalno funkcioniranje membranskih procesa potrebne isključivo jednostruko nezasićene masne kiseline, od kojih su najzastupljenije oleinska i palmitoleinska [15]. Iako ne posjeduje sustav desaturaza za proizvodnju PUFA, kvasac ima mehanizme pomoću kojih je u stanju unijeti masne kiseline (uključujući i PUFA) iz okolnog medija te ih ugraditi u svoje membranske lipide [19, 159]. Stoga, uz ranije navedene prednosti modelnog organizma, kvasac predstavlja pogodan sustav pomoću kojega se mogu istraživati specifični učinci PUFA na fiziologiju eukariotske stanice. Kako bi se izbjegla mogućnost oksidacije PUFA u hranjivom mediju, u ovom radu korišten je kvasac transformiran s funkcionalnim genom Δ 12 desaturazu iz biljke *Hevea brasiliensis*, koji u kontroliranim uvjetima u mediju s galaktozom proizvodi do 20% PUFA, od čega do 15% čini za čovjeka esencijalna linolna kiselina (ω -6 PUFA) [160]. Tako je priređen model u svrhu istraživanja temeljnih adaptivnih procesa do kojih dolazi kao posljedica prisutnosti PUFA, odnosno povećanja stupnja nezasićenosti bioloških membrana na razini eukariotske stanice. Kvasac predstavlja atraktivan modelni organizam u istraživanjima putova regulacije masnih kiselina i lipida, jer unatoč jednostavnom sastavu masnih kiselina (u usporedbi sa

odvedenijim eukariotskim sustavima), postoji visoki stupanj očuvanosti njihovih regulatornih procesa s čovjekom [85, 157]. Kvasac koji proizvodi PUFA, također predstavlja kondicionalni model pomoću kojega se mogu istraživati specifični stanični odgovori do kojih dolazi tijekom procesa lipidne peroksidacije, u svrhu razumijevanja sličnih patoloških procesa u eukariota [160]. Prijašnjim radom pokazano je da ovisno o tretmanu vodikovim peroksidom u soju s aktivnom $\Delta 12$ desaturazom dolazi do povećane proizvodnje krajnjeg produkta oksidacije linolne kiseline, 4-HNE-a, odnosno njegovih proteinskih konjugata [160].

Nadalje, našim prijašnjim istraživanjima na ovom modelu pokazano je da je prisutnost PUFA uzrokovala velike promjene na razini transkripcije, budući je došlo do značajnih promjena u ekspresiji preko 700 gena (u postupku objavljivanja). Zanimljivo, geni uključeni u proces β -oksidacije pokazali su povećanu ekspresiju ovisno o prisutnosti PUFA, uključujući i gen *POXI*, koji kodira za peroksisomalnu acil-CoA oksidazu, ključan protein u proces β -oksidacije [161]. Ovaj rezultat uputio je na hipotezu prema kojoj je enzimatska razgradnja masnih kiselina u procesu β -oksidacije jedan od procesa pomoću kojega stanica regulira optimalan sastav masnih kiselina tijekom adaptacije na prisutnost PUFA. Na ovakvu pretpostavku također su uputila dosadašnja istraživanja na kvascu koja su dovela u vezu proces β -oksidacije s regulacijom optimalnog sastava nezasićenih masnih kiselina u biološkim membranama [162-164]. Tijekom inicijalnog koraka β -oksidacije, djelovanjem proteina Pox1, dolazi do proizvodnje H_2O_2 , za čije uklanjanje je zadužena peroksisomalna katalaza Cta1, koja je također prijašnjim radom pokazala ulogu u staničnom odgovoru na prisutnost PUFA [178]. Jedan od ciljeva ovog rada bio je detaljnije ispitati ulogu β -oksidacije u adaptaciji stanica na prisutnost PUFA, koristeći mutante bez funkcionalnog gena *POXI* i *CTA1*. Budući da kvasac osim peroksisomalne katalaze A, posjeduje i citoplazmatsku katalazu T, kao kontrola korišten je i soj bez funkcionalnog gena za citoplazmatsku katalazu *CTT1*.

Suprotno pretpostavkama, prisutnost PUFA u nedostatku funkcionalne β -oksidacije, nije uzrokovala statistički značajne promjene u većini izmjerenih parametara u odnosu na kontrolni soj BYdesa. Prisutnost PUFA u mutantu *pox1desa* nije dodatno utjecala na fiziologiju rasta, kao ni na dodatno povećanje unutarstaničnog ROS-a. Također, iako je prisutnost PUFA uzrokovala indukciju antioksidacijske zaštite, što je bilo pokazano povećanjem unutarstaničnog GSH i povećanom aktivnosti katalaze, soj *pox1desa* nije pokazao razliku u odnosu na soj BYdesa. Nadalje, prisutnost PUFA u soju *pox1desa* nije uzorkovala povećanu osjetljivost na tretman vodikovim peroksidom, kao ni povećanu proizvodnju ROS-a ovisno o tretmanu H_2O_2 , u odnosu na soj BYdesa. Jedina razlika u odnosu na soj BYdesa,

izmjerena je u aktivnosti glutation-S-transferaza. Soj *pox1desa*, za razliku od ostalih sojeva, nije pokazao statistički značajno sniženje aktivnosti ovih enzima u odnosu na svoju kontrolu. Aktivnost glutation-S-transferaza direktno je povezana s metabolizmom GSH, te ima važnu ulogu u procesu detoksifikacije potencijalno štetnih ksenobiotika i produkata staničnog metabolizma, u što spadaju i reaktivni aldehidi nastali u procesu lipidne peroksidacije [148, 149]. Iznenadujuće je da je došlo do sniženja aktivnosti enzima s aktivnošću glutation-S-transferaze, iako su PUFA uzrokovale povećanje unutarstaničnog GSH. Međutim, točan uzrok ovakvom stanju tek treba biti objašnjen. Nadalje, nije jasan uzrok izostanka snižavanja glutation-S-transferazne aktivnosti u soju *pox1desa*. Zaključno, ne može se isključiti mogućnost da je proces β -oksidacije jedan od regulatornih mehanizama kojima stanice kvasca kontroliraju optimalan sastav masnih kiselina u prisutnosti PUFA. Međutim, dobiveni rezultati uputili su na zaključak da proces β -oksidacije nije ključan mehanizam prilikom adaptacije na prisutnost PUFA u korištenom modelu. Jedno od mogućih objašnjenja je da u izostanku β -oksidacije, mutant *pox1desa* pohranjuje višak masnih kiselina uključujući i PUFA, koje narušavaju homeostazu membranskih lipida, unutar razreda TAG, te na taj način kompenzira nedostatak navedenog procesa. Za potvrdu, trebala bi se napraviti dodatna analiza sastava masnih kiselina u mutantu *pox1desa*, te također analiza sastava masnih kiselina unutar razreda TAG.

Za razliku od soja *pox1desa*, soj bez peroksisomalne katalaze A pokazao je statistički značajnu razliku u gotovo svim izmjerenim parametrima u odnosu na soj BYdesa. Prisutnost PUFA, u soju *cta1desa*, uzrokovala je duže generacijsko vrijeme i raniji izlazak iz logaritamske faze rasta (niži OD₆₀₀) te povećanje proizvodnje unutarstaničnog ROS-a. Povećanje endogenog oksidacijskog stresa u soju *cta1desa* vjerojatan je uzrok dužem generacijskom vremenu te ranijem izlasku iz logaritamske faze ovog soja. Za razliku od ostalih sojeva, prisutnost PUFA u soju *cta1desa*, nije uzrokovala povećanje izmjerenih antioksidanasa (GSH i aktivnosti katalaze) u odnosu na vlastitu kontrolu, s time da je aktivnost glutation-S-transferaza bila snižena kao i u soju BYdesa. S toga, povećana osjetljivost ovog soja na tretman vodikovim peroksidom u prisutnosti PUFA, moguća je posljedica povećanja endogenog oksidacijskog stresa te smanjenja antioksidacijske zaštite u odnosu na ostale sojeve koje proizvode PUFA. Budući je aktivnost peroksisomalne katalaze primarno vezana za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u inicijalnom koraku β -oksidacije, izmjereno povećanje endogenog ROS-a u soju *cta1desa* može se pripisati povećanoj proizvodnji H₂O₂ tijekom β -oksidacije inducirane prisutnošću PUFA. Također

postoji mogućnost da je prisutnost PUFA dodatno inducirala proces β -oksidacije u svrhu povećane proizvodnje energije, neovisno o regulaciji sastava masnih kiselina. Da li je β -oksidacija u prisutnosti PUFA bila inducirana u svrhu regulacije sastava masnih kiselina ili povećane potrebe za proizvodnjom energije potrebno je dodatno istražiti. Nadalje, H_2O_2 koji nastaje u procesu β -oksidacije, mogao je bez zaštite peroksisomalne katalaze A dovesti do oksidacijskih oštećenja PUFA i endogenih membrana (uključujući i peroksisome), što je posljedično moglo doprinijeti povećanju koncentracije ROS-a te izmjerenim promjenama u soju *ctt1*desa.

U usporedbi sa sojem bez peroksisomalne katalaze A, prisutnost PUFA u nedostatku funkcionalne katalaze T nije uzrokovala statistički značajne razlike u većini izmjerenih parametara u odnosu na soj BYdesa. U ovom radu pokazana je povećana aktivnost katalaza ovisno o prisutnosti PUFA. Izmjerena aktivnost najvećim dijelom može se pripisati citoplazmatskoj katalazi T, budući je njen izostanak, u oba *ctt1* soja, rezultirao do deset puta nižom aktivnosti katalaze. Međutim prisutnost PUFA u soju *ctt1*desa nije dovela do dodatnog povećanja endogenog oksidacijskog stresa, kao niti povećanja unutarstaničnog glutaciona u odnosu na soj BYdesa. Nadalje, prisutnost PUFA u soju *ctt1*desa nije dodatno utjecala na osjetljivost ovisno o tretmanu vodikovim peroksidom. Iz ovih rezultata moguće je zaključiti da iako katalaza T ima esencijalnu ulogu u zaštiti stanice kvasca od oksidacijskih oštećenja, njezina uloga nije esencijalna u prisutnosti PUFA te upućuje na postojanje kompezatornih mehanizama antioksidacijske zaštite. Na ovaj način potvrđena je puno važnija uloga peroksisomalne katalaze A u inicijalnom procesu adaptacije na prisutnost PUFA u stanici kvasca u mediju s galaktozom. Nadalje, unatoč deset puta nižoj aktivnosti katalaze u soju *ctt1* u odnosu na divlji tip kvasca (BY), prisutnost PUFA uzrokovala je povećanu aktivnost katalaze. Izmjerena aktivnost može se pripisati djelovanju peroksisomalne katalazi A. Ovaj rezultat indirektno implicira da je izmjereno povećanje aktivnosti peroksisomalne katalaze posljedica povećane indukcije procesa β -oksidacije u prisutnosti PUFA, te posljedično tome i povećanoj potrebi za uklanjanjem vodikovog peroksida nastalog u ovom procesu.

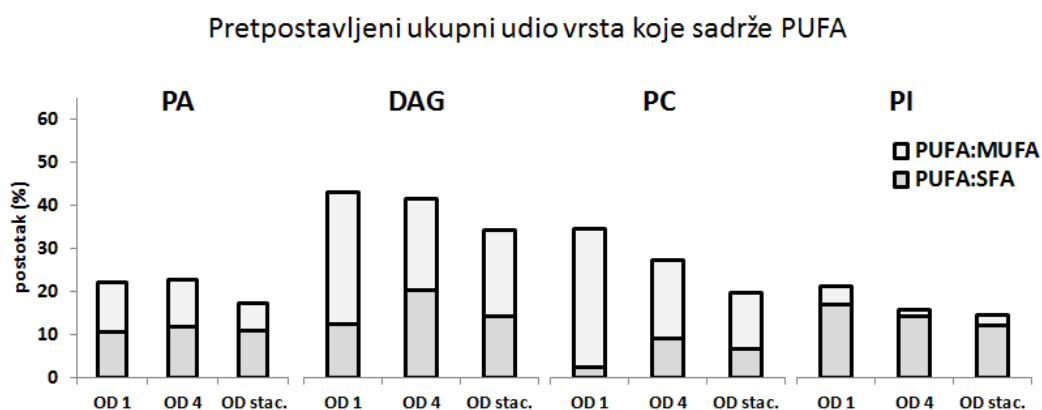
Kako bi se validirao model u kojem je gen za $\Delta 12$ desaturazu integriran u kromosom, ispitan je sastav masnih kiselina u novom soju (Y7092desa). Sastav masnih kiselina bio je gotovo identičan kao i u soju s episomalnom ekspresijom gena za $\Delta 12$ desaturazu (BYdesa) [160]. Međutim, iako prisutnost PUFA u oba soja nije uzrokovala promjenu generacijskog vremena u logaritamskoj fazi rasta u odnosu na sojeve bez PUFA, soj Y7092desa nije pokazao duži period prilagodbe prilikom promjene izvora šećera u galaktozu kakav je

zabilježen kod soja BYdesa. Nadalje, soj Y7092desa nije pokazao raniji izlazak iz logaritamske faze, te je dosegao isti OD₆₀₀ kao i soj Y7092 u stacionarnoj fazi. Uzrok ovakvih promjena za sada nije poznat te se može pripisati specifičnosti soja.

U nastavku istraživanja, cilj je bio proučiti putove ugradnje PUFA unutra različitih razreda glicerolipida te adaptivne promjene koje se dešavaju na razini metabolizma lipida u uvjetima povećanja stupnja nezasićenosti bioloških membrana uzrokovanih PUFA-ma. U tu svrhu napravljena je detaljna kvantifikacija osnovnih razreda glicerolipida i njihovih vrsta u soju s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu (Y7092desa) te kontrolnom soju koji ne proizvodi PUFA (Y7092). Ova analiza napravljena je u tri različite faze rasta, odnosno tri različita vremena od početka akumulacije PUFA u stanici. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je zastupljenost ukupnih količina pojedinih lipidnih razreda velikim dijelom u skladu s literaturnim podacima [70, 179]. Međutim, između sojeva Y7092 i Y7092desa, zabilježene su tek manje razlike (10-15%) u ukupnim količinama pojedinih razreda glicerolipida u određenim fazama rasta iz kojih se ne mogu jasno zaključiti adaptivne promjene uzrokovane prisutnošću PUFA. Ovakav rezultat doveo je do zaključka, da su PUFA u korištenom modelu imale minimalan utjecaj na uspostavljenu ravnotežu između ukupnih količina analiziranih razreda glicerolipida na razini cijele stanice.

Iz pregleda lipidnih vrsta, vidljiva je nejednaka distribucija PUFA među glicerolipidnim razredima. Iako su predominantne vrste koje u svom sastavu sadrže PUFA bile vrste s tri dvostruke veze, također je bila moguća proizvodnja vrsta s dvije dvostruke veze koje sadrže kombinaciju PUFA i zasićene masne kiseline (SFA). Međutim, zbog ograničenja korištene metode nije bilo moguće razlikovati vrste s dvije dvostruke veze koje sadrže kombinaciju dvije jednostruko nezasićene masne kiseline (MUFA) od vrsta koje sadrže SFA i PUFA. Kromatografskom analizom masenog spektra lipidnih vrsta, uočena je podjela kromatograma vrsta s dvije dvostruke veze na dva vrha. Zabilježena podjela vrhova jasno upućuje na postojanje dviju zasebnih izoformi unutar vrsta s dvije dvostruke veze, međutim zbog metodoloških ograničenja nije bilo moguće napraviti njihovu zasebnu integraciju te ih je računalni program kvantificirao kao jednu lipidnu vrstu. Spomenuti kromatogrami zabilježeni su isključivo u prisutnosti PUFA u soju Y7092desa, te s toga jasno impliciraju postojanje vrsta s kombinacijom SFA i PUFA. Nadalje, ovakve promjene zabilježene su specifično unutar lipidnih razreda PA, PC, DAG i PI. Unutar ovih razreda prisutnost PUFA uzrokovala je značajno snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom, te je s toga za pretpostaviti da je došlo do proizvodnje vrsta koje imaju kombinaciju SFA i PUFA kao kompenzacija. Budući

da nije bilo moguće razlikovati te time niti kvantificirati vrste koje sadrže dvije MUFA od vrsta koje sadrže PUFA i SFA, na osnovu sniženja vrsta s jednom dvostrukom vezom napravljena je pretpostavka o udjelima vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PC, PA, DAG i PI (slika 50). Ovakva pretpostavka nije napravljena za razrede PE i PS, budući analizom kromatograma masenog spektra njihovih vrsta s dvije dvostruke veze, nije zabilježena podjela vrhova kao u gore spomenutim razredima. Unutar razreda PE i PS zabilježen je relativno nizak udio vrsta s jednom dvostrukom vezom, te nije došlo do značajnog snižavanja ovih vrsta u odnosu na kontrolni soj. S toga je i logična pretpostavka da je unutar ova dva razreda udio vrsta koje sadrže kombinaciju PUFA i SFA bio minimalan u odnosu na dominantne izmjerene vrste s tri dvostruke veze.



Slika 50. Pretpostavljeni udio vrsta koje sadrže kombinaciju SFA i PUFA pridodan je vrstama s tri dvostruke veze koje su se mogle kvantificirati.

U eukariotskim organizmima, uključujući i kvasca (*S. cerevisiae*), PA je osnovni prekursor u sintezi svih glicerolipida [71]. U stanicama kvasca, djelovanjem enzima CDP-diacilglicerid sintetaze (Cds1) od PA nastaje CDP-DAG, direktan prekursor u sintezi razreda PI i PS, a djelovanjem enzima fosfatidat fosfataze (Pah1) od PA nastaje DAG, direktan prekursor Kenedijeovog puta, u kojem nastaju razredi PC, PE i TAG [71]. U soju Y7092desa, PUFA su uzrokovale povećanje stupnja nezasićenosti unutar razreda PA, budući je zabilježeno značajno snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom kao kompenzacija pretpostavljenoj proizvodnji vrsta koje sadrže kombinaciju PUFA i SFA te je također došlo do proizvodnje vrsta s tri dvostruke veze kao kompenzacija vrstama koje sadrže kombinaciju dvije MUFA. Očekivano, u srednjoj logaritamskoj fazi u oba soja, došlo je do značajnog povećanja ukupnih količina PA kao posljedice intenzivne diobe stanica, te povećane potrebe

za sintezom lipida [179]. Povećanje ukupnih količina PA u srednjoj logaritamskoj fazi, popraćeno je snižavanjem ukupnih količina PI, u oba soja, što je vjerojatna posljedica iscrpljivanja suplementiranog inozitola u SD mediju. Smanjenje koncentracije suplementiranog inozitola direktno utječe na smanjenje sinteze PI, te povećanje količina PA koja posljedično utječe na indukciju gena uključenih u biosintezu glicerolipida [71]. Međutim, unatoč promjenama ukupnih količina PA, ovisno o fazi rasta u oba soja relativni udjeli vrsta PA, ovisno o broju dvostrukih veza ostali su gotovo nepromijenjeni u sve tri faze rasta, uz manji trend smanjenja stupnja nezasićenosti vrsta u stacionarnoj fazi. Ovakav rezultat uputio je na zaključak da stanica kvasca, neovisno o fazi rasta (te prisutnosti PUFA u soju Y7092desa), održava relativno ujednačen sastav masnih kiselina unutar PA. Stoga, indikativno je da su specifična distribucija lipidnih vrsta te promjene koje su se dešavale u pojedinim razredima glicerolipida ovisno o fazi rasta bili regulirani nizvodno od sinteze PA.

Iz dosadašnjih literaturnih podataka o kvascu, ali i odvedenijim eukariotskim organizmima poput čovjeka, poznato je da dolazi do specifične raspodjele masnih kiselina unutar različitih razreda glicerofosfolipida [38, 187]. Iako stanice kvasca mogu značajno varirati sastav masnih kiselina unutar pojedinih razreda glicerolipida, ovisno o fazi rasta i uvjetima uzgoja, velikim djelom lipidni razredi zadržavaju karakterističan stupanj nezasićenosti lipidnih vrsta [187]. Međutim, točni mehanizmi koji reguliraju selektivnu raspodjelu masnih kiselina unutar lipidnih razreda tek su djelomično razjašnjeni [51, 187], prvenstveno zbog činjenice što nije dovoljno detaljno istražena supstratna specifičnost većine enzima uključenih u sintezu glicerolipida nizvodno od PA, ovisno o sastavu acilnih lanaca [187]. U pravilu, udio zasićenih masnih kiselina unutar razreda glicerofosfolipida opada po redu $PI > PS > PC > PE$ [38, 70, 179], a sličan trend zabilježen je i u ovom radu. U kontrolnom soju, Y7092, najveći stupanj nezasićenosti zabilježen je unutar razreda PE s preko 80% udjela vrsta s dvije dvostruke veze, dok su PI bili razred s najnižim stupnjem nezasićenosti, s čak do 80% udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom. Ovakva distribucija lipidnih vrsta bila je relativno ujednačena u sve tri analizirane faze rasta, što upućuje na visoki stupanj očuvanosti sastava acilnih lanaca unutar ova dva lipidna razreda. Gledano s evolucijske strane, visoka zastupljenost nezasićenih masnih kiselina unutar razreda PE, vjerojatna je posljedica očuvanja njihove osnovne biološke uloge uvođenja negativne unutarnje zakrivljenosti u sustave bioloških membrana [100]. Kako se ovo svojstvo razreda PE povećava dužinom acilnih lanaca te stupnjem nezasićenosti, logična je predominantna zastupljenost vrsta 34:2 kod kvasca [97]. Nadalje, poznato je da su kod sisavaca PE, razred s

najvećom zastupljenosti PUFA (AA ili DHA, ovisno o organu) među glicerofosfolipidima, što također nudi dokaz o evolucijski očuvanom mehanizmu, u kojem dolazi do obogaćivanja razreda PE (P)UFA-ma, u svrhu očuvanja njihove osnovne biološke uloge [51]. Naravno, kod sisavaca, posljedično razvoju specijaliziranih stanica i tkiva te postojanju puno šireg spektra fiziološki važnih masnih kiselina (uključujući i PUFA), došlo je i do razvoja kompleksnijih uloga PE u moduliranju svojstava membrana te interakciji sa specijaliziranim membranskim proteinima [32, 42]. Pretpostavlja se da su odvedenije funkcije ovog lipidnog razreda, direktna posljedica nadogradnje njihove osnovne biološke strukture/funkcije, za koju je bitna očuvanosti visokog stupnja nezasićenosti masnih kiselina. Nadalje, PI su unatoč ujednačenom sastavu lipidnih vrsta, pokazali značajne varijacije ukupnih količina ovisno o fazi rasta (za razliku od PE), što je u skladu s literaturnim podacima [179]. Poznato je da kod kvasca dolazi do značajnih promjena ukupnih količina PI ovisno o uvjetima rasta, prvenstveno dostupnosti inozitola u hranjivom mediju [188, 189]. Unatoč tome, PI su razred koji pokazuju najmanju varijabilnost sastava acilnih lanaca ovisno o vanjskim podražajima i promjenama uvjeta rasta [38, 179, 190]. Kod kvasca, biološka važnost visoke očuvanosti zasićenih masnih kiselina, odnosno vrsta s jednom dvostrukom vezom unutar PI nije razjašnjena, iako je za pretpostaviti da je generalna očuvanost lipidnih vrsta PI proizašla iz njihove važne uloge u regulaciji membranskih procesa koji se mogu narušiti promjenom sastava masnih kiselina. Donekle je moguća usporedba sa sličnim mehanizmom kod odvedenijih organizama poput sisavaca, gdje također postoji velika očuvanost sastava masnih kiselina unutar razreda PI [51]. Npr., kod štakora je poznato da su PI jedini razred glicerolipida koji sadrži specifičan sastav masnih kiselina u svim organima, točnije predominantnu kombinaciju stearinske i arahidonske kiseline, što je velikim djelom regulirano specifičnim afinitetom enzima uključenih u ciklus sinteze PI [51].

Za razliku od razreda PE i PI, sastav masnih kiselina unutar razreda PC i PS puno je više podložan promjenama ovisno o uvjetima rasta te vanjskim podražajima [179]. U ranoj logaritamskoj fazi rasta, unutar razreda PC, u soju Y7092, zabilježen visoki udio vrsta s dvije dvostruke veze (~80%). Međutim, pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu došlo je do značajnog snižavanja stupnja nezasićenosti PC te su vrste s dvije dvostruke veze sačinjavale ~50% udjela. Kod kvasca, sličan trend snižavanja nezasićenosti lipidnih vrsta unutar razreda PC, ovisno o fazi rasta, zabilježen je u literaturi, iako biološka uloga ovakve promjene nije razjašnjena [179]. U stacionarnoj fazi, zadržan je sličan stupanj nezasićenosti lipidnih vrsta PC kao i u srednjoj logaritamskoj fazi. Unutar razreda PS, u soju Y7092, sastav masnih

kiselina bio je relativno ujednačen u prve dvije faze rasta, s time da su vrste s dvije dvostruke veze činile oko 70% ukupnog udjela vrsta PS. U stacionarnoj fazi, došlo je do značajnog snižavanja stupnja nezasićenosti lipidnih vrsta PS te je udio vrsta s dvije dvostruke veze snižen na ~43%, međutim biološka uloga ovakve promjene također se za sada ne može objasniti. Dobiveni rezultati potvrđuju dosadašnje spoznaje o većoj plastičnosti razreda PS i PC prema promjenama sastava acilnih lanaca. PC su najzastupljeniji razred glicerofosfolipida kod kvasca kao i većine eukariotskih organizama, a posljedično visokom udjelu i cilindričnoj strukturi, PC imaju važnu ulogu u arhitekturi te moduliranju fizikalnih svojstava bioloških membrana. Povećana varijabilnost sastava masnih kiselina unutar ovog razreda (u odnosu na ostale razrede glicerofosfolipida) vjerojatno je evolucijska prilagodba pomoću koje se ovisno o uvjetima rasta te vanjskim podražajima može utjecati na svojstva bioloških membrana, bez štetnih posljedica za stanicu. Razred PS zastupljen je u puno manjem udjelu u odnosu na PC, a biološka funkcija ovog razreda pretežno proizlazi iz negativnog naboja njegove anionske „glave“ pri fiziološkom pH. Kod kvasca, PS služe kao osnovni prekursori u sintezi razreda PE [86, 191], iako je npr. opisana i njihova specifična uloga u lokalizaciji i aktivaciji male GTPaze Cdc42, tijekom stanične diobe i parenja [192]. Snižavanje stupnja nezasićenosti vrsta PS u stacionarnoj fazi rasta upućuju na zaključak da je za biološku ulogu ovog razreda, osim njihovog anionskog svojstva u specifičnim uvjetima rasta poput stacionarne faze također važan i sastav masnih kiselina.

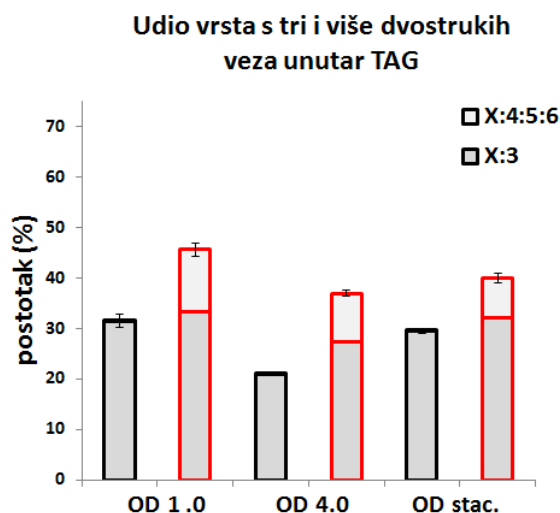
U soju Y7092desa zabilježena je nejednaka distribucija vrsta koje sadrže PUFA između analiziranih razreda glicerolipida. Iako je i u prisutnosti PUFA zadržan opći trend nezasićenosti lipidnih razreda kao u kontrolnom soju (Y7092), PUFA su uzrokovale povećanje stupnja nezasićenosti (udio vrsta s dvije i tri dvostruke veze) u pojedinim razredima glicerolipida. Unutar razreda PI i PS, čija sinteza ide preko zajedničkog prekursora CDP-DAG, udio vrsta s tri dvostruke veze, koje sadrže PUFA, u sve tri faze rasta, bio je jednak ili niži njihovom udjelu u zajedničkom prekursoru PA. Iako nije bilo moguće kvantitativno odrediti CDP-DAG, na osnovu dobivenih rezultata može se pretpostaviti da je je sastav acilnih lanaca unutar CDP-DAG bio sličan onome unutar razreda PA. Nadalje, slično kao i u kontrolnom soju, unatoč bliskom biosintetskom putu između razreda PI i PS zabilježene su velike razlike u stupnju nezasićenosti lipidnih vrsta što je vjerojatna posljedica selektivnosti enzima fosfatidilserin sinatze (Cho1) i fosfatidilinozitol sinatze (Pis1) prema supstratu CDP-DAG, ovisno o sastavu acilnih lanaca [187]. Posljedično puno većem stupnju nezasićenosti razreda PS, u prisutnosti PUFA zabilježen je i veći udio vrsta s tri dvostruke veze u odnosu na

PI. Nadalje, PUFA su uzrokovale snižavanje ukupnih količina PS za oko 15% u prve dvije faze rasta ($p < 0,05$). Budući PS, ovisno o svom negativnom naboju, imaju regulatornu ulogu u membranskim procesima, izmjereno sniženje ukupnih količina PS moguća je adaptacija stanica na povećanje stupnja nezasićenosti membrana, u svrhu očuvanja integriteta membranskih procesa. Unutar PI zabilježen je najniži udio vrsta s tri dvostruke veze od svih analiziranih razreda glicerolipida, što je u skladu s očuvanjem niskog udjela nezasićenosti ovog razreda. Međutim, PUFA u soju Y7092desa su uzrokovale snižavanje proizvodnje vrsta s jednom dvostrukom vezom te povećanje vrsta s dvije dvostruke veze, što je dovelo do značajnog povećanja stupnja nezasićenosti razreda PI u odnosu na kontrolni soj (udio vrsta s jednom dvostrukom vezom snižen je na ~60%). Unatoč tome, pretpostavljamo da je snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom u soju Y7092desa bilo velikim djelom kompenzirano proizvodnjom vrsta koje sadrže kombinaciju SFA i PUFA (slika 50.). Ovakav rezultat upućuje na zaključak da iako enzim *Pis1* pokazuje veliku selektivnost prema vrstama CDP-DAG koje sadrže SFA, s druge strane pokazuje manju selektivnost između MUFA i PUFA.

Za razliku od anionskih glicerofosfolipida (PS i PI) u kojima je udio vrsta s tri dvostruke veze (koje sadrže PUFA) bio niži ili jednak njihovom udjelu unutar PA, razredi zwitter-ionskih glicerofosfolipida (PC i PE) su pokazali značajno povećanje udjela vrsta s tri dvostruke veze. Unutar PE, koji u uvjetima bez suplementiranog etanolamina (kakvi su korišteni u ovom radu) većinom nastaju konverzijom razreda PS, zabilježen je gotovo dvostruko veći udio vrsta s tri dvostruke veze u odnosu na PS. Budući da su od svih glicerofosfolipida PE razred s najvećim stupnjem nezasićenosti, povećani udio vrsta koje sadrže PUFA (prvenstveno 34:3) vjerojatna je posljedica djelovanja enzima PS dekarboksilaza (*Psd1* i *Psd2*) odgovornih za konverziju PS u PE. Iako do sada nije okarakterizirana specifičnost ovih enzima prema sastavu acilnih lanaca [187], može se pretpostaviti da su ovi enzimi odgovorni za obogaćivanje razreda PE s vrstama 34:2, odnosno vrstama 34:3 u soju Y7092desa. Ovaj rezultat je zanimljiv budući upućuje na zaključak da sustav PS dekarboksilaza unatoč povećanom afinitetu prema vrstama s dvije nezasićene masne kiseline ne pokazuje razliku između vrsta koje imaju kombinaciju dvije MUFA i vrsta koje sadrže kombinaciju MUFA i PUFA.

U soju Y7092desa, unutar razreda DAG, odnosno zajedničkog prekursora u sintezi lipida Kenedijevo putu, zabilježen je značajan pomak prema nezasićenim lipidnim vrstama u odnosu na njihov udio unutar PA. Prvenstveno, zabilježeno je veliko povećanje udjela vrsta s

tri dvostruke veze koje sadrže PUFA te je došlo do značajnog snižavanja vrsta s jednom dvostrukom vezom. Kao što je ranije objašnjeno, snižavanje vrsta s jednom dvostrukom vezom vrlo vjerojatno je posljedica povećane proizvodnje vrsta s kombinacijom SFA i PUFA, što je također potkrijepljeno analizom kromatograma vrsta DAG s dvije dvostruke veze. Ovakvo obogaćivanje razreda DAG s vrstama koje sadrže PUFA upućuje na zaključak da stanica posjeduje selektivne mehanizme kojima se odvajaju zalihe vrsta PA za proizvodnju DAG i sintezu lipida Kenedijevog puta, od vrsta s nižim udjelom PUFA za sintezu CDP-DAG (PI i PS). Literaturne spoznaje također upućuju na postojanje za sada još nerazjašnjenog selektivnog mehanizma kojim se različite subpopulacije vrsta PA, ovisno o sastavu acilnih lanaca, usmjeravaju prema Kenedijevom ili CDP-DAG putu [187, 193]. Različita distribucija PUFA između glicerolipida koji nastaju jednim od ova dva osnovna puta, moguća je posljedica različitog afiniteta enzima Cds1 i Pah1 prema njihovom zajedničkom supstratu PA ovisno o sastavu acilnih lanaca, iako ne postoje literaturni podaci koji bi sa sigurnošću potkrijepili ovakvu pretpostavku [187]. Također, u soju Y7092desa, zabilježen je relativno visoki stupanj korelacije lipidnih vrsta između razreda DAG i PC. Veza između ova dva lipidna razreda posebno je vidljiva u ranoj logaritamskoj fazi rasta, budući je unutar razreda PC također zabilježen visoki udio vrsta s tri dvostruke veze, iako i puno niži udio vrsta s jednom dvostrukom vezom. Stoga je indikativno da u prisutnosti PUFA Kenedijev put značajno pridonosi ukupnoj količini vrsta PC. Nadalje, unutar razreda TAG koji također nastaju Kenedijevim putem, izmjereno je značajno povećanje udjela vrsta s tri ili više dvostrukih veza u odnosu na kontrolni soj Y7092desa (slika 51), a zabilježeno povećanje stupnja nezasićenosti također bilo je u dobroj korelaciji s razredom DAG. Poznato je da TAG, kod kvasca, imaju važnu ulogu u pohranjivanju viška potencijalno štetnih masnih kiselina koje mogu narušiti homeostazu staničnih membrana [19]. Iz dobivenih rezultata, moguća je pretpostavka da se u prisutnosti PUFA, Kenedijevim putem izdvaja višak nezasićenih masnih kiselina prema razredima PC ili TAG, te da je ovakav mehanizam primarno reguliran u koraku sinteze DAG. Ova hipoteza potkrijepljena je i ranije opisanom ulogom razreda PC u pohranjivanju masnih kiselina koje narušavaju staničnu homeostazu te visokoj toleranciji, odnosno varijabilnosti u sastavu masnih kiselina, pri čemu najviše doprinosi sinteza PC preko Kenedijevog puta [187] [97]. Zaključno, povećani udio vrsta s tri dvostruke veze unutar razreda DAG i PC te povećanje stupnja nezasićenosti TAG, nudi objašnjenje o mogućem mehanizmu kojim stanica kvasca u upotrebljenom modelu i u prisutnosti PUFA preko Kenedijevog puta regulira višak nezasićenih masnih kiselina.



Slika 51. Kako bi se procijeni stupanj nezasićenosti unutar razreda TAG, izračunat je udio vrsta s tri (X:3) ili više dvostrukih veza (X:4:5:6) unutar ukupne količine TAG.

Iako je specifičan sastav acilnih lanaca glicerolipida velikim djelom reguliran na putu njihove sinteze, za održavanje stabilnog stanja lipidnih vrsta podjednako je važan proces njihovog remodeliranja u ciljnim membranama (Landov ciklus). Do sada je na kvascu najviše pažnje posvećeno procesu remodeliranja razreda PC te je opisana uloga brojnih enzima uključenih u ovaj proces [187]. U ovom radu je uz osnovne razrede glicerolipida, analiziran i sastav razreda LPC, koji predstavlja jedan od prijelaznih oblika koji nastaju specifično u procesu remodeliranja i obrta razreda PC [187]. U soju Y7092desa, PUFA su uzrokovale značajno povećanje ($p < 0,05$) ukupnih količina LPC u odnosu na kontrolni soj. Ovakav rezultat ukazuje da unatoč tome što razred PC pokazuje veliku toleranciju prema sastavu acilnih lanaca, u uvjetima povećanog sastava PUFA, postoji potreba za povećanim remodeliranjem ovog razreda. Razred PC, posljedično visokom udjelu imaju važan utjecaj na fizikalna svojstva bioloških membrana, a visoki udio PUFA unutar ovog razreda dovodi do povećanja nezasićenosti i procesa lipidne peroksidacije, što može narušiti membranske procese. Stoga je i razumljiv povećani stupanj remodeliranja ovog razreda u prisutnosti PUFA. Analizirano kroz faze rasta, pokazano je da je unutar razreda PC udio vrsta koje sadrže PUFA u direktnoj korelaciji s povećanjem ukupnih količina LPC budući je snižavanje udjela vrsta koje sadrže PUFA popraćeno i smanjenom razlikom ukupnih količina u odnosu na kontrolni soj. Zaključno, prisutnost PUFA dovodi do narušavanja homeostaze membrana, te indukcije procesa remodeliranja i obrta PC, u svrhu očuvanja integriteta membrana.

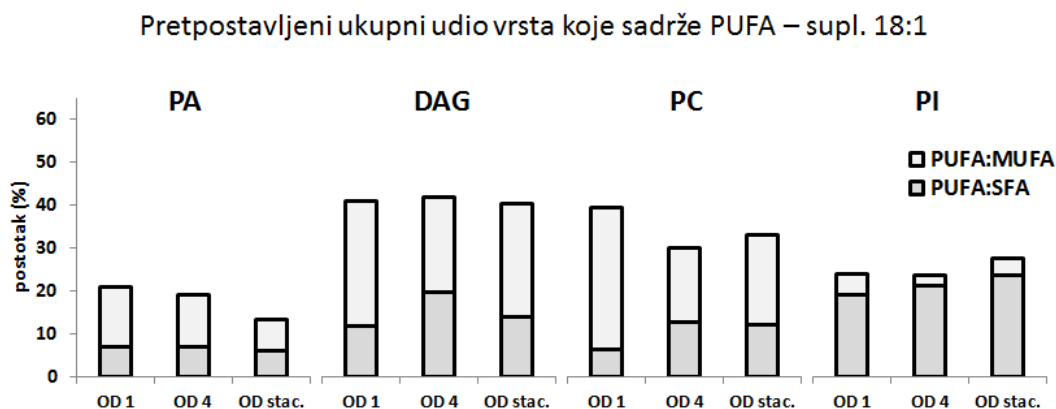
Nadalje, cilj je bio ispitati adaptivne promjene na razini metabolizma glicerolipida, koje se dešavaju tijekom prilagodbe stanica kvasca na prisutnost PUFA. U tu svrhu analiziran je sastav glicerolipidnih razreda u tri različita vremena (faze rasta) od početka indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su zabilježene promjene u soju Y7092desa velikim djelom bile posljedica promjene faze rasta, neovisno o prisutnosti PUFA, budući je zabilježen sličan trend promjena kao i u kontrolnom soju, Y7092. Unutar razreda PE, PI i u prve dvije faze rasta unutar PS zabilježena je stabilna raspodjela lipidnih vrsta, uz manje promjene, te je i u prisutnosti PUFA održavana uspostavljena ravnoteža lipidnih vrsta. Najznačajnije promjene u sastavu lipidnih vrsta zabilježene su unutar razreda PC pri prijelazu iz rane u srednju logaritamsku fazu te unutar razreda PS pri prijelazu stacionarnu fazu, međutim sličan trend je zabilježen i u kontrolnom soju. U soju Y7092desa, snižavanje stupnja nezasićenosti lipidnih vrsta unutar razreda PC u srednjoj logaritamskoj fazi popraćeno je značajnim snižavanjem vrsta s tri dvostruke veze i pretpostavljenim povećanjem udjela vrsta koje sadrže kombinaciju SFA i PUFA kao kompenzacija proizvodnji vrsta s jednom dvostrukom vezom. Zabilježene promjene unutar razreda PC, u dobroj su korelaciji s promjenama unutar razreda DAG, u oba soja, stime da je u soju Y7092desa pri prijelazu u srednju logaritamsku fazu unutar DAG također zabilježen pad udjela vrsta s tri dvostruke veze i pretpostavljeno povećanje vrsta koje sadrže kombinaciju PUFA i SFA. Dinamika promjena stupnja nezasićenosti lipidnih vrsta kakve su zabilježene unutar razreda DAG i PC bila je komplementarna promjenama koje su zabilježene unutar razreda TAG, u obadva soja. Ovaj rezultat potvrđuje važnu ulogu lipida Kenedijevog puta u regulaciji stupnja nezasićenosti staničnih membrana, ovisno o trenutnim potrebama stanice, te na regulatorni mehanizam koji je kontroliran u koraku sinteze DAG. Snižavanje stupnja nezasićenosti razreda PS u stacionarnoj fazi, u oba soja, moguća je posljedica regulacije sinteze lipida nizvodno od PS, konkretno razreda PE. U stacionarnoj fazi kao posljedica iscrpljivanja šećera i visoke gustoće kultura dolazi do drastičnog smanjivanja proliferacije stanica. Budući razred PE zbog svoje strukture ima važnu ulogu u procesima diobe stanica odnosno procesima fisije i fuzije membrana, izostanak stanične diobe može utjecati na regulaciju njegove sinteze. Postoje literaturni dokazi koji upućuju da je konverzija razreda PS u PE potaknuta većom hidrofornošću sastava acilnih lanaca, odnosno kraćim i manje zasićenim lancima, čime se olakšava njihov transport u mitohondrije gdje se odvija veliki dio konverzije PS u PE [194, 195]. Zabilježeno povećanje udjela vrsta s jednom dvostrukom vezom i pomak ravnoteže vrsta PS prema 34 vrstama upućuje na proces povećanja hidrofobnosti razreda PS u

stacionarnoj fazi. Dobiveni rezultat podupire ranije spomenutu teoriju, iako konkretni dokazi još uvijek manjkaju. U stacionarnoj fazi došlo je do snižavanja udjela vrsta koje sadrže PUFA u svim razredima glicerolipida, uključujući i njihov zajednički prekursor PA. Ovakvo snižavanje PUFA može se objasniti iscrpljivanjem galaktoze u mediju, u stacionarnoj fazi, te smanjenjem indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu, je posljedično moglo uzrokovati i smanjenu proizvodnju PUFA.

Suplementacija SD/gal medija oleinskom kiselinom, osim povećanja udjela suplementirane kiseline, rezultirala je i dvostrukim povećanjem udjela PUFA u soju Y7092desa, i to prvenstveno linolne kiseline koja nastaje desaturacijom oleinske kiseline, djelovanjem $\Delta 12$ desaturaze. Zanimljivo je da povećani udio PUFA nije uzrokovao promjene u fiziologiji rasta u odnosu na kontrolni soj. Očekivano, povećanje udjela oleinske kiseline u stanicama dovelo je do značajnog pomaka ravnoteže lipidnih vrsta prema dugolančanim 34 i 36 vrstama, iako je trend stupnja desaturacije lipidnih razreda ostao sličan kao i u mediju s galaktozom. Suplementacija oleinskom kiselinom, u oba soja, uzrokovala je značajno povećanje ukupnih količina PS te snižavanje ukupnih količina PI. Ovakve promjene djelomično se mogu objasniti značajnim snižavanjem udjela palmitoleinske kiseline (16:1), čime se smanjuje i udio 32 lipidnih vrsta. Iako za sada nema čvrstih literaturnih dokaza, neobjavljeni rezultati upućuju da smanjivanje vrsta PA 32:1 direktno utječe na smanjenje sinteze razreda PI te povećanje sinteze razreda PS. U objašnjenju, budući enzimi *Pis1* i *Cho1* koriste CDP-DAG kao zajednički supstrat, smanjenje sinteze PI utječe na povećanje konverzije CDP-DAG od strane *Cho1*, što posljedično dovodi do povećanja ukupnih količina PS.

Nadalje, povećanje udjela PUFA u uvjetima suplementacije rezultiralo je povećanjem udjela vrsta s tri dvostruke veze u gotovo svim lipidnim razredima, iako zabilježeno povećanje nije bilo proporcionalno rezultatima analize sastava masnih kiselina. Jedan od vjerojatnih uzroka je povećanje sinteze vrsta koje sadrže kombinaciju PUFA i SFA koje se nisu mogle kvantitativno odrediti. U prilog ovakvom zaključku ide činjenica da je analizom sastava masnih kiselina u soju Y7092desa zabilježeno značajno povećanje udjela palmitinske kiseline (16:0) u odnosu na kontrolni soj. Prema pretpostavljenom modelu kakav je napravljen i za uvjete bez suplementacije, unutar razreda PC i PI došlo je do značajnog povećanja udjela vrsta koje sadrže kombinaciju SFA i PUFA, u odnosu na uvjete bez suplementacije (slika 52.). Ovakav rezultat upućuje na regulatorni stanični mehanizam prema smanjenju zasićenosti lipidnih vrsta, u uvjetima povećanog udjela linolne kiseline. Međutim, prema

pretpostavljenom modelu, unutar PA došlo je do snižavanja udjela vrsta koje sadrže kombinaciju SFA i PUFA, u odnosu na uvjete bez suplementacije (uz manje povećanje udjela vrsta s tri dvostruke veze), što ponovno upućuje na važnost regulacije sastava masnih kiselina glicerolipida nizvodno od sinteze PA.



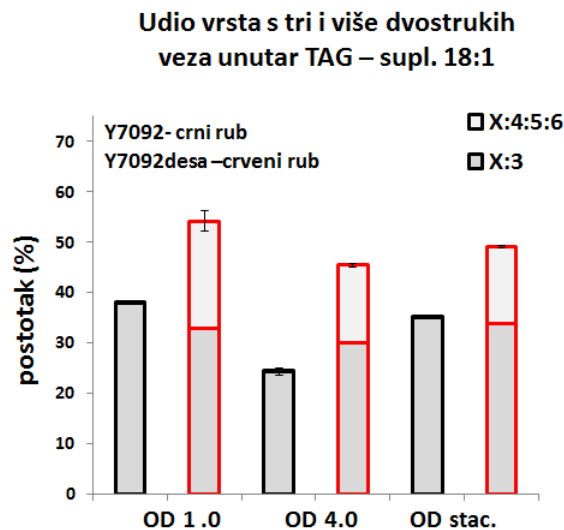
Slika 52. Pretpostavljeni udio vrsta koje sadrže kombinaciju SFA i PUFA pridodan je vrstama s tri dvostruke veze koje su se mogle kvantificirati.

U uvjetima povećanog udjela PUFA zadržan je pomak ravnoteže razreda DAG prema nezasićenim masnim kiselinama te visoki udio vrsta s tri dvostruke veze, iako nije došlo do značajnog povećanja u odnosu na uvjete bez suplementacije. Sukladno tomu, niti unutar razreda PC u ranoj logaritamskoj fazi nije došlo do njihovog povećanja u odnosu na uvjete bez suplementacije. Nadalje, unutar razreda TAG zadržan je sličan trend povećanja stupnja nezasićenosti lipidnih vrsta u odnosu na kontrolu, kao i u uvjetima bez suplementacije. Međutim, za razliku od razreda DAG i PC, došlo je do dvostrukog povećanja udjela vrsta s četiri i više dvostrukih veza koje sadrže PUFA. Ovakav rezultat potvrđuje važnu ulogu Kenedijevog puta, odnosno sinteze TAG-a u pohranjivanju viška potencijalno štetnih masnih kiselina te regulaciji nezasićenosti staničnih membrana i u uvjetima povećanog udjela PUFA. Nadalje, iako je i unutar razreda PS također zabilježeno manje povećanje udjela vrsta s tri dvostruke veze u odnosu na uvjete bez suplementacije, puno veće povećanje zabilježeno je unutar razreda PE. Ovakav porast vrsta koje sadrže PUFA u razredu PE najvjerojatnija je posljedica njegovog ranije opisanog biosintetskog puta, u kojem dolazi do obogaćivanja ovog razreda nezasićenim lipidnim vrstama, u koraku konverzije razreda PS u PE. S toga, povećani udio linolne kiseline rezultirao je povećanom proizvodnjom 34:3 PE vrsta, kao kompenzacija proizvodnji vrsta 34:2. Nadalje, i u uvjetima suplementacije, zabilježeno je značajno povećanje ukupnih količina LPC u odnosu na kontrolni soj, što je potvrdilo potrebu stanice za

remodeliranjem lipidnih vrsta PC nizvodno od njihove sinteze. Ovaj rezultat također se može pripisati narušenoj ravnoteži staničnih membrana u prisutnosti PUFA. U uvjetima suplementacije zabilježen je puno veći udio vrsta LPC koje sadrže linolnu kiselinu, čime se također dovodi u vezu narušavanje membranske homeostaze od strane vrsta PC koje sadrže linolnu kiselinu i povećanje procesa njihovog obrta i remodeliranja.

Ako se izuzme povećanje u udjelima PUFA, zabilježene promjene unutar pojedinih razreda glicerolipida u prve dvije faze rasta, velikim dijelom usporedive su s promjenama izmjerenima i u uvjetima bez suplementacije. Najznačajnije razlike, u odnosu na uvjete bez suplementacije, zabilježene su u stacionarnoj fazi. U uvjetima suplementacije također je došlo do značajnog snižavanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PA, vjerojatno kao posljedica iscrpljivanja galaktoze te smanjenja indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu. Međutim, dok je u uvjetima bez suplementacije ovakav trend bio popraćen generalnim snižavanjem udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar gotovo svih razreda glicerolipida, u uvjetima suplementacije nije došlo do njihovog snižavanja (PE) ili je došlo do povećavanja njihovih udjela (PC, DAG, PI). Ovakve promjene rezultirale su povećanjem ukupnih količina razreda TAG i PS za oko 40% te PA za oko 25% u odnosu na kontrolni soj. Unatoč povećanju ukupnih količina razreda TAG, nije došlo do značajnog povećanja udjela vrsta koje sadrže PUFA u odnosu na prethodnu fazu. Dapače, došlo je do smanjenja razlike stupanja nezasićenosti lipidnih vrsta u odnosu na kontrolu (u usporedbi s prethodnom fazom), što je bio sličan trend kao i u uvjetima bez suplementacije (slika 53). Nadalje, unutar razreda PS, također je zabilježeno značajno povećanje stupnja zasićenosti lipidnih vrsta u oba soja, a u soju Y7092desa, sukladno snižavanju vrsta s dvije dvostruke veze, također je došlo do značajnog snižavanja vrsta koje sadrže PUFA kao i u uvjetima bez suplementacije. Uzrok zabilježenih promjena za sada je nepoznat, međutim evidentno je da u uvjetima suplementacije, u stacionarnoj fazi, soj Y7092desa teže regulira proizvodnju PUFA te dolazi do njihove povećane ugradnje unutar u razreda DAG, PC i PI. Stacionarna faza predstavlja nepovoljne uvjete za stanicu, budući da osim iscrpljivanja izvora šećera, velike gustoće kultura, snižavanja pH medija, te visoke koncentracije nusprodukata staničnog metabolizma dolazi i do povećanja oksidacijskog stresa [196, 197]. Stoga, povećanje udjela PUFA u membranskim sustavima, u za stanicu stresnim uvjetima kakvi su karakteristični za stacionarnu fazu može negativno utjecati na membranske procese te može dovesti do povećanja lipidne peroksidacije. Prema literaturnim podacima, prisutnost PUFA u stanici kvasca u stacionarnoj fazi dovodi do povećanja unutarstaničnog ROS-a u odnosu na

logaritamsku fazu [25]. S toga je i logična pretpostavka da u stacionarnoj fazi, u soju Y7092desa, dolazi do povećanja oksidacijskih oštećenja PUFA te narušavanja integriteta bioloških membrana. U takvim uvjetima, jedan od mogućih staničnih odgovora je i zabilježeno povećanje ukupnih količina TAG za koje je opisana uloga u izuzimanju potencijalno štetnih masnih kiselina u svrhu očuvanja narušene membranske homeostaze [19].



Slika 53. Kako bi se procijenio stupanj nezasićenosti unutar razreda TAG, izračunat je udio vrsta s tri (X:3) ili više dvostrukih veza (X:4:5:6) unutar ukupne količine TAG.

Slično povećanje ukupnih količina razreda PS nije moguće u potpunosti objasniti u svijetlu trenutnih literaturnih spoznaja. Međutim, moguć je mehanizam u kojem posljedično povećanju zasićenosti ovog lipidnog razreda te snižavanju vrsta koje sadrže PUFA, dolazi do povećanja ukupnih količina ovog razreda kako bi se uspostavila ravnoteža odnosno smanjio stupanj nezasićenosti staničnih membrana.

Kako bi se razjasnile genske osnove promjena u metabolizmu masnih kiselina i drugih važnih metaboličkih puteva, korištena je SGA metoda. Ova metoda omogućuje identifikaciju „esencijalnih“ gena koji stanicama kvasca omogućavaju preživljene u prisutnosti PUFA i to u fiziološkim uvjetima i uvjetima oksidacijskog stresa. Gen $\Delta 12$ desaturazu ugrađen je u kompletnu kolekciju od 4300 jednostrukih mutanata te je ispitan utjecaj PUFA na njihov rast. U fiziološkim uvjetima, u mediju s galaktozom, koja je korištena za indukciju gena $\Delta 12$ desaturazu, identificirano je 78 mutanata u kojima su PUFA uzrokovale inhibiciju rasta veću od 50%, što je bilo određeno usporedbom veličine kolonija na pločama s agarom u odnosu na kontrolu bez PUFA. Međutim, pokazano je da je inhibicija rasta u svim dobivenim sojevima

bila isključiva posljedica nemogućnosti rasta na galaktozi, neovisno o prisutnosti PUFA. Ovakav rezultat uputio je na zaključak da galaktoza kao izvor šećera nije bila najbolje rješenje za izvođenje ovakvog eksperimenta, budući je osim navedenih mutanata i veliki broj drugih mutanata pokazao djelomičnu inhibiciju rasta na galaktozi. Posljedično tome, veliki broj sojeva morao je biti izuzet iz analize budući da zbog navedene interferencije utjecaja galaktoze nije bilo moguće procijeniti utjecaj PUFA na rast velikog broja sojeva. U ostalim mutantima koji nisu pokazali fenotipske razlike ovisno o galaktozi, prisutnost PUFA nije uzrokovala mjerljive razlike u rastu. Zaključno, PUFA, u upotrebljenom modelu, nisu uzrokovale promjene koje bi dovele do značajne inhibicije rasta u izostanku samo jednog gena. No, to ne isključuje promjene na razini genske regulacije, aktivacije i inhibicije grupe gena određenih metaboličkih puteva. Ovaj model se, prema tome, može koristiti u daljnjem izučavanju puteva regulacije PUFA u stanici kvasca korištenjem kompleksnijeg pristupa s višestrukim mutantima koji bi potpuno inhibirali određeni metabolički put.

U nastavku, sojevi dobiveni metodom SGA, testirani su u prisutnosti PUFA na osjetljivost na oksidacijski agens, na podlozi s *tert*-butil hidroperoksidom. Ovim pristupom identificirano je 217 jednostrukih mutanata kod kojih je prisutnost PUFA u uvjetima oksidacijskog stresa uzrokovala inhibiciju rasta veću od 50% u odnosu na kontrolne sojeve. Identificirani geni svrstani su prema staničnim procesima. Za prikaz rezultata, u obzir su uzeti samo identificirani geni čiji je udio unutar grupe, ovisno o procesu, bio veći od udjela svih gena koji su uključeni u taj proces na razini kompletnog genoma. Najveći broj identificiranih gena (26,6%) dio su grupe čija funkcija u stanici ovisno o procesu još nije jasno utvrđena. Ostali identificirani geni uključeni su u široki spektar staničnih procesa: odgovor na kemijske podražaje, metabolizam ugljikovodika, signalne putove, odgovor na oštećenja DNA, popravak DNA, odgovor na oksidacijski stres, fosforilaciju proteina, transport iona, endosomalni transport te staničnu homeostazu iona. Sukladno interesu tematike, koja je okrenuta prema istraživanjima oksidacijskog stresa, lipidne peroksidacije i regulacije lipidnog metabolizma, za daljnji rad izabrani su sojevi čija je funkcija bliska navedenim procesima. Do sada su potvrđeni fenotipovi u 14 jednostrukih mutanata (od 217) u kojima je prisutnost PUFA u nedostatku navedenog gena, uzrokovala povećanu osjetljivost na oksidacijski stres: *GLR1*, *GRX1*, *MXR2*, *TSA2* (stanični odgovor na oksidacijski stres), *RAS1*, *RAS2*, *SRO7*, *VPS74* (signalni putovi), *BSD2* (transport iona), *RCY1*, *VPS24* (endosomalni transport), *DNF1* i *LEM3* (transport lipida).

Uloga enzima glutation reduktaze, Glr1 i glutaredoksina, Grx1 lako se može povezati s dobivenim fenotipom, budući je poznata njihova antioksidacijska uloga u stanici [198]. Nadalje, sustav Glr1 i Grx1 povezan je preko GSH, budući se oksidirani oblik Grx1 reducira pomoću GSH, za čiju redukciju je opet zadužen enzim Glr1. Sustav Glr1 i Grx1 ima ulogu u zaštiti citoplazme od oksidacijskih oštećenja, iako enzim Glr1 također ima važnu ulogu i u zaštiti mitohondrija. Ovaj rezultat također je zanimljiv budući u stanici, osim Grx1, postoji i drugi glutaredoksin, Grx2. Iako se ova dva glutaredoksina međusobno preklapaju u funkciji, izostanak Grx2 nije uzrokovao povećanu osjetljivost stanica kvasca na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA. Enzim, metionin-R-sulfoksid reduktaza, Mxr2, štiti stanicu od oksidacijskih oštećenja proteina koji sadrže metionin, budući sudjeluje u redukciji oksidiranog oblika metionin sulfoksida (Met-O) [199, 200]. Opisana je njegova uloga u zaštiti proteina tijekom procesa UPR (engl. unfolded protein response) te u zaštiti oksidacijskih oštećenja proteinskih kompleksa u mitohondriju. Osim enzima Mxr2, kod kvasca postoji i druga metionin-S-sulfoksid reduktaza, Mxr1, koja unatoč sličnom mehanizmu djelovanja pokazuje stereospecifičnu razliku u afinitetu prema supstratu Met-SO, dok enzim Mxr2 pokazuje stereospecifičan afinitet prema supstratu Met-RO. Protein tioredoksin peroksidaza, Tsa2, spada u porodicu peroksiredoksina, čija uloga u stanici je sačuvana od bakterija do čovjeka. Kod kvasca, postoji pet peroksiredoksina, od koji Tsa1 i Tsa2 pokazuju veliki stupanj međusobne homologije [201]. Mehanizam njihovog djelovanja bazira se na peroksidaznoj aktivnosti pri čemu između ostalog koriste tioredoksin (Trx) kao davatelj elektrona za reakcije redukcije. Iako je u fiziološkim uvjetima Tsa1 zastupljenija u stanici, Tsa2 je pokazala povećanje indukcije u uvjetima oksidacijskog stresa preko poznatog Yap1 transkripcijskog faktora koji kontrolira ekspresiju brojnih gena uključenih u antioksidacijsku zaštitu stanice. Nadalje, zanimljivo, nedostatak gena *RAS1* i *RAS2* uzrokovao je povećanu osjetljivost kvasca u prisutnosti PUFA na oksidacijski stres. Ras1 i Ras2 su membranski proteini s GTP-aznom aktivnošću te sudjeluju u prijenosu signala putem aktivacije adenilat ciklaze [202]. Ras2 je paralog proteina Ras1, koji je nastao duplikacijom genoma. Oba proteina funkcionalni su homolozi Ras proto-onkogeni kod sisavaca. Ova dva proteina imaju važnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa, citokinezi i parenju. Ovim radom povezana je njihova regulatorna uloga s oksidacijskim oštećenjima membrana u prisutnosti PUFA. Nadalje, od identificiranih gena, dobro je opisana uloga proteina Lem3 i Dnf1 [203]. Protein Lem3 primarno je lokaliziran u plazma membrani i ER-u i reagira direktno s proteinom Dnf1, koji spada u porodicu tip 4 P-tip ATP-aza. Protein Lem3 odgovoran je za biološku funkciju proteina Dnf1, budući sudjeluje

u njegovom transportu iz ER-a i lokalizaciju u ciljno mjesto u plazma membrani. Ova dva proteina zajedno formiraju kompleks koji je odgovoran za transverzalni transport i održavanje asimetrije lipida plazma membrane te posljedično tome imaju važnu ulogu u procesima endocitoze i održavanja polarnosti stanica. Uloga ova dva proteina do sada nije dovedena u vezu s regulacijom membrana u uvjetima oksidacijskog stresa te oksidacije PUFA. Nadalje, protein Rcy1 ima ulogu u procesu recikliranja proteina plazma membrane u procesu endocitoze. Međutim, pokazana je i njegova uloga kao fosfolipidne translokaze [204], što dovodi u vezu važnost ovog procesa u obrani stanice od oksidacijskih oštećenja membrana, posebno u prisutnosti PUFA.

Neki od identificiranih gena po prvi puta dovedeni su u vezu sa staničnim odgovorom na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA te pružaju ogroman potencijal za buduća istraživanja u korištenom modelu. Nadalje, veliki broj identificiranih gena kod kvasca ima funkcionalne homologe s odvedenijih organizama poput čovjeka. Dobiveni rezultati mogli bi imati u budućnosti veliki značaj prilikom razjašnjavanja patoloških stanja kod čovjeka u kojima dolazi do oksidacijskih oštećenja PUFA i procesa lipidne peroksidacije.

5. ZAKLJUČCI

1. U modelu upotrebljenom u ovom radu, β -oksidacija u procesu adaptacije na prisutnost PUFA nije neophodan proces u stanici kvasca niti u fiziološkim uvjetima niti u uvjetima oksidacijskog stresa.
2. Peroxisomalna katalaza A ima ulogu u zaštiti stanice kvasca od oksidacijskih oštećenja u prisutnosti PUFA, budući bez nje dolazi do povećanja generiranja endogenog ROS-a, što utječe na sporiji rast i raniji prekid logaritamske faze rasta.
3. Povećana osjetljivost soja *cta1*desa na tretman vodikovim peroksidom, vjerojatna je posljedica povećanog endogenog oksidacijskog stresa u prisutnosti PUFA te izostanka povećanja antioksidacijske zaštite (GSH i aktivnosti katalaze).
4. Iako citoplazmatska katalaza T ima esencijalnu ulogu u antioksidacijskoj zaštiti stanice kvasca u uvjetima oksidacijskog stresa, njena uloga nije esencijalna u staničnom odgovoru ovisno o prisutnosti PUFA, ni u fiziološkim uvjetima ni u uvjetima oksidacijskog stresa. Stoga, od dvije katalaze, peroksisomalna katalaza A ima važniju ulogu u zaštiti stanica kvasca tijekom inicijalne adaptacije na prisutnost PUFA.
5. Sinteza PUFA, u korištenom modelu, nije uzrokovala narušavanje uspostavljene ravnoteže ukupnih količina analiziranih razreda glicerolipida te su zabilježene tek manje promjene unutar pojedinih razreda.
6. Iako je prisutnost PUFA zabilježena u svim analiziranim razredima glicerolipida, unutra lipida Kenedijevog puta (DAG, PC i TAG) zabilježen je povećani udio vrsta koje sadrže PUFA, što je kontrolirano u koraku sinteze DAG.
7. Udio vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PC direktno utječe na povećanje procesa remodeliranja i obrta ovog razreda što je pokazano značajnim povećanjem ukupnih količina LPC u soju Y7092desa.
8. Dinamika promjena koje su se dešavale na razini ukupnih količina i lipidnih vrsta analiziranih razreda glicerolipida, ovisno o vremenu indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu, velikim djelom je pratila promjene ovisne o fazi rasta, budući je sličan trend zabilježen i u kontrolnom soju.
9. U stacionarnoj fazi, došlo je do snižavanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar PA te većini glicerolipida, što je vjerojatna posljedica iscrpljivanja galaktoze te smanjene indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu.
10. Suplementacija medija oleinskom kiselinom u prisutnosti galaktoze rezultirala je gotovo dvostrukim povećanjem udjela PUFA (prvenstveno linolne kiseline) u soju

Y7092desa. Međutim povećani udio PUFA nije promijenio fiziologiju rasta soja Y7092desa u odnosu na kontrolni soj.

11. Povećani udio PUFA, u uvjetima suplementacije oleinskom kiselinom, rezultirao je i povećanim udjelima vrsta koje sadrže PUFA unutar većine analiziranih razreda lipida. Najveće povećanje vrsta koje sadrže PUFA zabilježeno je unutar razreda PE i TAG.
12. U uvjetima suplementacije oleinskom kiselinom, u stacionarnoj fazi, zabilježen je trend povećanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar glicerolipidnih razreda, što je suprotno promjenama kakve su zabilježene u uvjetima bez suplementacije.
13. Povećanje udjela PUFA u stacionarnoj fazi, u uvjetima suplementacije oleinskom kiselinom, rezultiralo je značajnim povećanjem ukupnih količina TAG (40%), PS(40%) i PA (25%) u odnosu na kontrolni soj. Iako je udio vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda TAG ostao na razini prethodne faze, povećana sinteza TAG upućuje na narušenu homeostazu membrana te indukciju sinteze TAG u svrhu izuzimanja PUFA iz sustava bioloških membrana.
14. Veliki broj sojeva korišten u metodi SGA morao je biti izuzet iz analize kao posljedica slabog rasta jednostrukih mutanata na podlozi s galaktozom. U ostalim mutantima, prisutnost PUFA nije uzrokovala mjerljive promjene u rastu na agaroznim pločama s galaktozom.
15. U uvjetima oksidacijskog stresa, ovisno o tretmanu tBH, identificirano je 217 jednostrukih mutanata koji su pokazali povećanu inhibiciju rasta u prisutnosti PUFA. Identificirani geni imaju ulogu u staničnim procesima: odgovor na kemijske podražaje, metabolizam ugljikohidrata, odgovor na oksidacijski stres, odgovor na oštećenja DNA, signalne putove, popravak DNA, fosforilaciju proteina, transport iona, endosomalne procese te za sada nepoznate ulogu. .
16. Od 217 identificiranih mutanata osjetljivih na oksidacijski stres u prisutnosti PUFA, potvrđeni su fenotipovi 14 sojeva: *GLR1*, *GRX1*, *MXR2*, *TSA2* (stanični odgovor na oksidacijski stres), *RAS1*, *RAS2*, *SRO7*, *LEM3*, *VPS74* (signalni putovi), *BSD2* (transport iona), *RCY1* i *VPS24* (endosomalni transport) te *DNF1* i *LEM3* (transport lipida).
17. Dobiveni rezultati mogli bi u budućnosti doprinijeti boljem razumijevanju patoloških stanja kod čovjeka u kojima dolazi do oksidacijskih oštećenja PUFA i procesa lipidne peroksidacije.

6. LITERATURA

1. Hulbert, A.J., *Life, death and membrane bilayers*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(14): p. 2303-2311.
2. Shaikh, S.R. and M. Edidin, *Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(6): p. 1277-89.
3. Pamplona, R., *Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2008. **1777**(10): p. 1249-1262.
4. Sies, H. and E. Cadenas, *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1985. **311**(1152): p. 617-31.
5. Gueraud, F., et al., *Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products*. Free Radical Research, 2010. **44**(10): p. 1098-1124.
6. Hulbert, A.J., *Metabolism and longevity: is there a role for membrane fatty acids?* Integr Comp Biol, 2010. **50**(5): p. 808-17.
7. Reed, T.T., *Lipid peroxidation and neurodegenerative disease*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **51**(7): p. 1302-1319.
8. Catala, A., *Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions*. Chem Phys Lipids, 2009. **157**(1): p. 1-11.
9. Halliwell, B., *Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?* Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 410-8.
10. Gill, I. and R. Valivety, *Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications*. Trends Biotechnol, 1997. **15**(10): p. 401-9.
11. Wallis, J.G., J.L. Watts, and J. Browse, *Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?* Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**(9): p. 467-473.
12. Black, P.N. and C.C. DiRusso, *Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(3): p. 286-298.
13. Tehlivets, O., K. Scheuringer, and S.D. Kohlwein, *Fatty acid synthesis and elongation in yeast*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(3): p. 255-270.
14. Hashimoto, K., et al., *The repertoire of desaturases for unsaturated fatty acid synthesis in 397 genomes*. Genome Inform, 2006. **17**(1): p. 173-83.
15. Martin, C.E., C.S. Oh, and Y. Jiang, *Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(3): p. 271-85.
16. Tocher, D.R., M.J. Leaver, and P.A. Hodgson, *Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases*. Prog Lipid Res, 1998. **37**(2-3): p. 73-117.
17. Hashimoto, K., et al., *The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes*. J Lipid Res, 2008. **49**(1): p. 183-91.
18. Futerman, A.H., R. Ghidoni, and G. van Meer, *Lipids: regulatory functions in membrane traffic and cell development*. Kfar Blum Kibbutz Guest House, Galilee, Israel, May 10-15, 1998. EMBO J, 1998. **17**(23): p. 6772-5.
19. Petschnigg, J., et al., *Good Fat, Essential Cellular Requirements for Triacylglycerol Synthesis to Maintain Membrane Homeostasis in Yeast*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(45): p. 30981-30993.
20. Kohlwein, S.D., *Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 15663-7.

21. Vanderrest, M.E., et al., *The Plasma-Membrane of Saccharomyces-Cerevisiae - Structure, Function, and Biogenesis*. Microbiological Reviews, 1995. **59**(2): p. 304-322.
22. Vereb, G., et al., *Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8053-8.
23. Lee, A.G., *Biological membranes: the importance of molecular detail*. Trends in Biochemical Sciences, 2011. **36**(9): p. 493-500.
24. Fan, J., M. Sammalkorpi, and M. Haataja, *Formation and regulation of lipid microdomains in cell membranes: Theory, modeling, and speculation*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1678-1684.
25. Ruenwai, R., et al., *Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in Saccharomyces cerevisiae causes a global transcriptional response resulting in reduced proteasomal activity and increased oxidative stress*. Biotechnol J, 2011. **6**(3): p. 343-56.
26. Hazel, J.R., *Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation*. Annual Review of Physiology, 1995. **57**: p. 19-42.
27. Olbrich, K., et al., *Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers*. Biophysical Journal, 2000. **79**(1): p. 321-327.
28. Smaby, J.M., et al., *Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol*. Biophys J, 1997. **73**(3): p. 1492-505.
29. Feller, S.E., K. Gawrisch, and A.D. MacKerell, Jr., *Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(2): p. 318-26.
30. Rawicz, W., et al., *Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers*. Biophysical Journal, 2000. **79**(1): p. 328-339.
31. Koenig, B.W., H.H. Strey, and K. Gawrisch, *Membrane lateral compressibility determined by NMR and x-ray diffraction: effect of acyl chain polyunsaturation*. Biophysical Journal, 1997. **73**(4): p. 1954-66.
32. Lee, A.G., *How lipids affect the activities of integral membrane proteins*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2004. **1666**(1-2): p. 62-87.
33. Wassall, S.R., et al., *Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids - The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation*. Chem Phys Lipids, 2004. **132**(1): p. 79-88.
34. Turk, H.F. and R.S. Chapkin, *Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(1): p. 43-7.
35. Harris, R.B., et al., *Fatty acid composition of red blood cell membranes and risk of squamous cell carcinoma of the skin*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(4): p. 906-12.
36. Abbott, S.K., P.L. Else, and A.J. Hulbert, *Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA*. British Journal of Nutrition, 2010. **103**(4): p. 522-529.
37. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
38. Schneiter, R., et al., *Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane*. J Cell Biol, 1999. **146**(4): p. 741-54.

39. Tuller, G., et al., *Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources*. *Yeast*, 1999. **15**(14): p. 1555-1564.
40. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. *Biotechnol J*, 2006. **1**(4): p. 420-39.
41. Spector, A.A., *Essentiality of fatty acids*. *Lipids*, 1999. **34 Suppl**: p. S1-3.
42. Stillwell, W. and S.R. Wassall, *Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*. *Chem Phys Lipids*, 2003. **126**(1): p. 1-27.
43. Salem, N., Jr., et al., *Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system*. *Lipids*, 2001. **36**(9): p. 945-59.
44. Weldon, K.A. and J. Whelan, *Allometric scaling of dietary linoleic acid on changes in tissue arachidonic acid using human equivalent diets in mice*. *Nutr Metab (Lond)*, 2011. **8**(1): p. 43.
45. Whelan, J. and L. Jones, *Allometric scaling: Determining human equivalent doses for n-3 PUFA in rodent diets*. *Faseb Journal*, 2006. **20**(4): p. A550-A550.
46. Lands, W.E.M., et al., *Selective Incorporation of Poly-Unsaturated Fatty-Acids into Phosphatidylcholine by Rat-Liver Microsomes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1982. **257**(24): p. 4968-4972.
47. Schmid, P.C., E. Deli, and H.H. Schmid, *Generation and remodeling of phospholipid molecular species in rat hepatocytes*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **319**(1): p. 168-76.
48. Yamashita, A., T. Sugiura, and K. Waku, *Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells*. *J Biochem*, 1997. **122**(1): p. 1-16.
49. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults*. *Reprod Nutr Dev*, 2005. **45**(5): p. 581-97.
50. Stulnig, T.M., *Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. **132**(4): p. 310-21.
51. Epand, R.M., *Recognition of polyunsaturated acyl chains by enzymes acting on membrane lipids*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1818**(4): p. 957-62.
52. Ivanov, I., et al., *Molecular enzymology of lipoxygenases*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. **503**(2): p. 161-74.
53. Shaikh, S.R. and M. Edidin, *Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection*. *Chem Phys Lipids*, 2008. **153**(1): p. 24-33.
54. Nakamura, M.T., et al., *Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids*. *Lipids*, 2004. **39**(11): p. 1077-83.
55. Hishikawa, D., et al., *Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 2830-5.
56. Chakravarthy, B.R., M.W. Spence, and H.W. Cook, *Turnover of Phospholipid Fatty Acyl Chains in Cultured Neuroblastoma-Cells - Involvement of Deacylation-Reacylation and Denovo Synthesis in Plasma-Membranes*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1986. **879**(3): p. 264-277.
57. Hazel, J.R., et al., *Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Functional-Significance of Changes in Phospholipid Molecular-Species Composition*. *Lipids*, 1991. **26**(4): p. 277-282.

58. Aguilar, P.S. and D. de Mendoza, *Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans*. Mol Microbiol, 2006. **62**(6): p. 1507-14.
59. Shimomura, I., et al., *Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(52): p. 35299-306.
60. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
61. Rawson, R.B., *Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus*. Proteases in Biology and Medicine, 2002. **38**: p. 155-168.
62. Rawson, R.B., *Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)*. Proteases and the Regulation of Biological Processes, 2003. **70**: p. 221-231.
63. Lee, J.N., et al., *Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33772-83.
64. Zhang, S.R., Y. Skalsky, and D.J. Garfinkel, *MGA2 or SPT23 is required for transcription of the Delta 9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1999. **151**(2): p. 473-483.
65. Hoppe, T., et al., *Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing*. Cell, 2000. **102**(5): p. 577-86.
66. Nakagawa, Y., et al., *Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **291**(3): p. 707-713.
67. Bossie, M.A. and C.E. Martin, *Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity*. Journal of Bacteriology, 1989. **171**(12): p. 6409-13.
68. Kandasamy, P., et al., *Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis in Saccharomyces: the endoplasmic reticulum membrane protein, Mga2p, a transcription activator of the OLE1 gene, regulates the stability of the OLE1 mRNA through exosome-mediated mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(35): p. 36586-92.
69. Dowhan, W., *Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?* Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 199-232.
70. Ejsing, C.S., et al., *Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2136-41.
71. Henry, S.A., S.D. Kohlwein, and G.M. Carman, *Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2012. **190**(2): p. 317-349.
72. Fahy, E., et al., *A comprehensive classification system for lipids*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 839-61.
73. Fahy, E., et al., *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S9-14.
74. Daum, G., et al., *Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(16): p. 1471-1510.
75. Daum, G., *Lipids of mitochondria*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1985. **822**(1): p. 1-42.
76. Buckland, A.G. and D.C. Wilton, *Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions*. Biochimica Et Biophysica Acta, 2000. **1483**(2): p. 199-216.

77. Hicks, A.M., et al., *Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(9): p. 1022-9.
78. Vance, J.E. and R. Steenbergen, *Metabolism and functions of phosphatidylserine*. *Prog Lipid Res*, 2005. **44**(4): p. 207-34.
79. Daum, G., et al., *Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism*. *Yeast*, 1999. **15**(7): p. 601-14.
80. Shewan, A., D.J. Eastburn, and K. Mostov, *Phosphoinositides in Cell Architecture*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(8).
81. Bell, R.M., L.M. Ballas, and R.A. Coleman, *Lipid topogenesis*. *J Lipid Res*, 1981. **22**(3): p. 391-403.
82. Henneberry, A.L., M.M. Wright, and C.R. McMaster, *The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity*. *Molecular Biology of the Cell*, 2002. **13**(9): p. 3148-3161.
83. Huijbregts, R.P., L. Topalof, and V.A. Bankaitis, *Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking*. *Traffic*, 2000. **1**(3): p. 195-202.
84. Nohturfft, A. and S.C. Zhang, *Coordination of Lipid Metabolism in Membrane Biogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **25**: p. 539-566.
85. Gaspar, M.L., et al., *The emergence of yeast lipidomics*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(3): p. 241-54.
86. Birner, R., et al., *Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae**. *Molecular Biology of the Cell*, 2001. **12**(4): p. 997-1007.
87. Vance, J.E., *Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(7): p. 1377-87.
88. van Meer, G., *Cellular lipidomics*. *EMBO J*, 2005. **24**(18): p. 3159-65.
89. Devaux, P.F. and R. Morris, *Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes*. *Traffic*, 2004. **5**(4): p. 241-246.
90. Daleke, D.L., *Phospholipid flippases*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(2): p. 821-825.
91. Ikeda, M., A. Kihara, and Y. Igarashi, *Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes*. *Biol Pharm Bull*, 2006. **29**(8): p. 1542-6.
92. Lenoir, G., P. Williamson, and J.C. Holthuis, *On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport*. *Curr Opin Chem Biol*, 2007. **11**(6): p. 654-61.
93. Devaux, P.F., et al., *How lipid flippases can modulate membrane structure*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008. **1778**(7-8): p. 1591-1600.
94. Dowhan, W., *Molecular genetic approaches to defining lipid function*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S305-10.
95. Cole, L.K., J.E. Vance, and D.E. Vance, *Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2012. **1821**(5): p. 754-61.
96. Li, Z. and D.E. Vance, *Phosphatidylcholine and choline homeostasis*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(6): p. 1187-94.
97. de Kroon, A.I., *Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae**. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(3): p. 343-52.
98. Exton, J.H., *Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1212**(1): p. 26-42.
99. Cui, Z. and M. Houweling, *Phosphatidylcholine and cell death*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2002. **1585**(2-3): p. 87-96.

100. Epand, R.M., N. Fuller, and R.P. Rand, *Role of the position of unsaturation on the phase behavior and intrinsic curvature of phosphatidylethanolamines*. Biophysical Journal, 1996. **71**(4): p. 1806-1810.
101. Epand, R.M., *Lipid polymorphism and protein-lipid interactions*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1998. **1376**(3): p. 353-68.
102. Vance, J.E., *Thematic review series: Glycerolipids. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids*. J Lipid Res, 2008. **49**(7): p. 1377-1387.
103. Storey, M.K., et al., *Phosphatidylethanolamine has an essential role in Saccharomyces cerevisiae that is independent of its ability to form hexagonal phase structures*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(51): p. 48539-48548.
104. Wu, L.N., B.R. Genge, and R.E. Wuthier, *Analysis and molecular modeling of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-phosphate complex associated with biomineralization*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(7): p. 3827-38.
105. Leventis, P.A. and S. Grinstein, *The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 407-27.
106. Lentz, B.R., *Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(5): p. 423-38.
107. Chaurio, R.A., et al., *Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation*. Molecules, 2009. **14**(12): p. 4892-914.
108. Barlow, C.A., R.S. Laishram, and R.A. Anderson, *Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(1): p. 25-35.
109. Corda, D., et al., *The glycerophosphoinositols and their cellular functions*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**: p. 101-107.
110. Delage, E., et al., *Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: convergences and divergences among eukaryotic kingdoms*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(1): p. 1-14.
111. Payraastre, B., *Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases*. Methods Mol Biol, 2004. **273**: p. 201-12.
112. Vicinanza, M., et al., *Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking*. EMBO J, 2008. **27**(19): p. 2457-70.
113. Siddiqui, R.A., et al., *Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action*. Mini Rev Med Chem, 2004. **4**(8): p. 859-71.
114. Ervin, R.B., et al., *Dietary intake of fats and fatty acids for the United States population: 1999-2000*. Adv Data, 2004(348): p. 1-6.
115. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases*. J Am Coll Nutr, 2002. **21**(6): p. 495-505.
116. Koch, L.G. and S.L. Britton, *Aerobic metabolism underlies complexity and capacity*. J Physiol, 2008. **586**(1): p. 83-95.
117. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, and B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. Toxicol Pathol, 2010. **38**(1): p. 96-109.
118. Bochkov, V.N., et al., *Generation and biological activities of oxidized phospholipids*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(8): p. 1009-59.
119. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, *Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(1): p. 125-69.

120. Sohal, R.S., *Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(1): p. 37-44.
121. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
122. Das, U.N., *Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999. **61**(3): p. 157-63.
123. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
124. Barrera, G., *Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 137289.
125. Castela, J.E. and M. Gago-Dominguez, *Risk factors for cardiovascular disease in women: relationship to lipid peroxidation and oxidative stress*. Med Hypotheses, 2008. **71**(1): p. 39-44.
126. Barja, G., *Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in state 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(4): p. 347-366.
127. Han, D., E. Williams, and E. Cadenas, *Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space*. Biochem J, 2001. **353**(Pt 2): p. 411-6.
128. Thomas, C., et al., *Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation*. Redox Report, 2009. **14**(3): p. 102-108.
129. Brown, G.C. and V. Borutaite, *There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 1-4.
130. Jamieson, D.J., *Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(16): p. 1511-1527.
131. Grant, C.M., G. Perrone, and I.W. Dawes, *Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(3): p. 893-898.
132. Meister, A., *Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(13): p. 9397-400.
133. Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura, *Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 73-6.
134. Kistler, M., K.H. Summer, and F. Eckardt, *Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res, 1986. **173**(2): p. 117-20.
135. Stephen, D.W.S. and D.J. Jamieson, *Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Fems Microbiology Letters, 1996. **141**(2-3): p. 207-212.
136. Rose, R.C., *Ascorbic-Acid Metabolism in Protection against Free-Radicals - a Radiation Model*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **169**(2): p. 430-436.
137. Nick, J.A., C.T. Leung, and F.A. Loewus, *Isolation and Identification of Erythroascorbic Acid in Saccharomyces-Cerevisiae and Lypomyces-Starkeyi*. Plant Science, 1986. **46**(3): p. 181-187.

138. Berndt, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1227-36.
139. Brigelius-Flohe, R., et al., *The effect of age on vitamin E status, metabolism, and function: metabolism as assessed by labeled tocopherols*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1031**: p. 40-3.
140. Bentinger, M., K. Brismar, and G. Dallner, *The antioxidant role of coenzyme Q. Mitochondrion*, 2007. **7 Suppl**: p. S41-50.
141. Chang, E.C., et al., *Genetic and biochemical characterization of Cu,Zn superoxide dismutase mutants in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4417-24.
142. Slekar, K.H., D.J. Kosman, and V.C. Culotta, *The yeast copper zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(46): p. 28831-28836.
143. Lushchak, V.I. and D.V. Gospodaryov, *Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in Saccharomyces cerevisiae*. Cell Biol Int, 2005. **29**(3): p. 187-92.
144. Cohen, G., et al., *Isolation of the catalase A gene of Saccharomyces cerevisiae by complementation of the cta1 mutation*. Mol Gen Genet, 1985. **200**(1): p. 74-9.
145. Collinson, L.P. and I.W. Dawes, *Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase*. Gene, 1995. **156**(1): p. 123-7.
146. Pedrajas, J.R., et al., *Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6366-73.
147. Galiano, F., A. Schiesser, and G. Rotilio, *Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **147**(3): p. 1200-5.
148. Oakley, A., *Glutathione transferases: a structural perspective*. Drug Metab Rev, 2011. **43**(2): p. 138-51.
149. Yang, Y., et al., *Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19220-30.
150. Collinson, E.J. and C.M. Grant, *Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(25): p. 22492-22497.
151. Riganti, C., et al., *The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(3): p. 421-436.
152. Perez-Ortin, J.E., J. Garcia-Martinez, and T.M. Alberola, *DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts*. J Biotechnol, 2002. **98**(2-3): p. 227-41.
153. *The yeast genome directory*. Nature, 1997. **387**(6632 Suppl): p. 5.
154. Zhu, H., et al., *Global analysis of protein activities using proteome chips*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2101-5.
155. Herskowitz, I., *Life cycle of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev, 1988. **52**(4): p. 536-53.
156. Martin, C.E., et al., *Yeast desaturases*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 1080-2.
157. Nielsen, J., *Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human*. FEBS Lett, 2009. **583**(24): p. 3905-3913.

158. Carman, G.M. and S.A. Henry, *Phospholipid biosynthesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae and interrelationship with other metabolic processes*. Prog Lipid Res, 1999. **38**(5-6): p. 361-99.
159. Ferreira, T.C., L.M. de Moraes, and E.G. Campos, *Cell density-dependent linoleic acid toxicity to Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2011. **11**(5): p. 408-17.
160. Cipak, A., et al., *Saccharomyces cerevisiae strain expressing a plant fatty acid desaturase produces polyunsaturated fatty acids and is susceptible to oxidative stress induced by lipid peroxidation*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(5): p. 897-906.
161. Hiltunen, J.K., et al., *The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(1): p. 35-64.
162. Marchesini, S. and Y. Poirier, *Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal beta-oxidation in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32596-601.
163. Lockshon, D., et al., *The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function*. Genetics, 2007. **175**(1): p. 77-91.
164. Poirier, Y., et al., *Peroxisomal beta-oxidation - A metabolic pathway with multiple functions*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2006. **1763**(12): p. 1413-1426.
165. Gietz, R.D. and R.A. Woods, *Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method*. Methods Enzymol, 2002. **350**: p. 87-96.
166. Chen, X.P., et al., *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy*. Free Radical Research, 2010. **44**(6): p. 587-604.
167. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
168. Tietze, F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues*. Anal Biochem, 1969. **27**(3): p. 502-22.
169. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
170. Aylon, Y. and M. Kupiec, *New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast*. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 2004. **566**(3): p. 231-248.
171. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
172. Murrieta, C.M., B.W. Hess, and D.C. Rule, *Comparison of acidic and alkaline catalysts for preparation of fatty acid methyl esters from ovine muscle with emphasis on conjugated linoleic acid*. Meat Sci, 2003. **65**(1): p. 523-9.
173. Ogiso, H. and R. Taguchi, *Reversed-Phase LC/MS Method for Polyphosphoinositide Analyses: Changes in Molecular Species Levels during Epidermal Growth Factor Activation in A431 Cells*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(23): p. 9226-9232.
174. Tong, A.H., et al., *Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2364-8.
175. Baryshnikova, A., et al., *Synthetic genetic array (SGA) analysis in Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol, 2010. **470**: p. 145-79.

176. Demir, O. and I. Aksan Kurnaz, *An integrated model of glucose and galactose metabolism regulated by the GAL genetic switch*. *Comput Biol Chem*, 2006. **30**(3): p. 179-92.
177. Fendt, S.M. and U. Sauer, *Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates*. *BMC Syst Biol*, 2010. **4**: p. 12.
178. Cipak, A., et al., *Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1781**(6-7): p. 283-7.
179. Klose, C., et al., *Flexibility of a eukaryotic lipidome--insights from yeast lipidomics*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35063.
180. Czabany, T., K. Athenstaedt, and G. Daum, *Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(3): p. 299-309.
181. Daum, G., et al., *Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast*. *Biochimie*, 2007. **89**(2): p. 243-248.
182. Gago-Dominguez, M., et al., *Opposing effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on mammary carcinogenesis: The Singapore Chinese Health Study*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(9): p. 1686-92.
183. Hulbert, A.J., et al., *Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1175-213.
184. Bennett, A., et al., *Measurement of arachidonate and its metabolites extracted from human normal and malignant gastrointestinal tissues*. *Gut*, 1987. **28**(3): p. 315-8.
185. Williams, C.D., et al., *A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer*. *Nutrition Research*, 2011. **31**(1): p. 1-8.
186. Rysman, E., et al., *De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation*. *Cancer Research*, 2010. **70**(20): p. 8117-8126.
187. de Kroon, A.I., P.J. Rijken, and C.H. De Smet, *Checks and Balances in Membrane Phospholipid Class and Acyl Chain Homeostasis, The Yeast Perspective*. *Prog Lipid Res*, 2013.
188. Gaspar, M.L., et al., *Inositol induces a profound alteration in the pattern and rate of synthesis and turnover of membrane lipids in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22773-85.
189. Kelley, M.J., et al., *Regulation of phospholipid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae by inositol. Inositol is an inhibitor of phosphatidylserine synthase activity*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(34): p. 18078-85.
190. Pilkington, B.J. and A.H. Rose, *Incorporation of unsaturated fatty acids by Saccharomyces cerevisiae: conservation of fatty-acyl saturation in phosphatidylinositol*. *Yeast*, 1991. **7**(5): p. 489-94.
191. Atkinson, K., S. Fogel, and S.A. Henry, *Yeast mutant defective in phosphatidylserine synthesis*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(14): p. 6653-61.
192. Fairn, G.D., et al., *Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity*. *Nature Cell Biology*, 2011. **13**(12): p. 1424-U98.
193. Zaremberg, V. and C.R. McMaster, *Differential partitioning of lipids metabolized by separate yeast glycerol-3-phosphate acyltransferases reveals that phospholipase D generation of phosphatidic acid mediates sensitivity to choline-containing lysolipids and drugs*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 39035-44.
194. Heikinheimo, L. and P. Somerharju, *Preferential decarboxylation of hydrophilic phosphatidylserine species in cultured cells. Implications on the mechanism of*

- transport to mitochondria and cellular aminophospholipid species compositions.* J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3327-35.
195. Heikinheimo, L. and P. Somerharju, *Translocation of phosphatidylthreonine and -serine to mitochondria diminishes exponentially with increasing molecular hydrophobicity.* Traffic, 2002. **3**(5): p. 367-77.
 196. Herman, P.K., *Stationary phase in yeast.* Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(6): p. 602-7.
 197. Chen, Q., Q. Ding, and J.N. Keller, *The stationary phase model of aging in yeast for the study of oxidative stress and age-related neurodegeneration.* Biogerontology, 2005. **6**(1): p. 1-13.
 198. Toledano, M.B., et al., *Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast.* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(13): p. 1699-711.
 199. Tarrago, L., et al., *Methionine sulfoxide reductases preferentially reduce unfolded oxidized proteins and protect cells from oxidative protein unfolding.* J Biol Chem, 2012. **287**(29): p. 24448-59.
 200. Kaya, A., et al., *Compartmentalization and regulation of mitochondrial function by methionine sulfoxide reductases in yeast.* Biochemistry, 2010. **49**(39): p. 8618-25.
 201. Wong, C.M., et al., *Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(7): p. 5385-5394.
 202. Tamanoi, F., *Ras signaling in yeast.* Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 210-5.
 203. Noji, T., et al., *Mutational analysis of the Lem3p-Dnf1p putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnf1p independent of the phospholipid-translocating activity of Dnf1p in yeast.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(1): p. 323-31.
 204. Furuta, N., et al., *Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway.* Molecular Biology of the Cell, 2007. **18**(1): p. 295-312.

7. SAŽETAK

Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) esencijalne su za održavanje normalne strukture i funkcije bioloških membrana kod većine organizama uključujući i čovjeka. Međutim, u uvjetima oksidacijskog stresa, kao posljedice poremećaja aerobnog metabolizma, PUFA su podložne lipidnoj peroksidaciji (LPO). LPO narušava integritet bioloških membrana, a krajnji produkti, reaktivni aldehidi, uključeni su u mnoge patofiziološke procese. Kvasac (*S. cerevisiae*) predstavlja dobar eukariotski model budući su molekularni putovi koji reguliraju metabolizam masnih kiselina i lipida velikim dijelom konzervirani od kvasca do čovjeka. Nadalje, kvasac ne proizvodi PUFA, ali ih je sposoban unijeti u stanicu iz okolnog medija i ugraditi u membranske lipide. Stoga, kvasac predstavlja izniman kondicionalni model s i bez PUFA, pomoću kojega se mogu istraživati putovi regulacije metabolizma PUFA, lipidne peroksidacije te adaptacije na njihovu promjenu u svrhu razumijevanja patoloških procesa u eukariota. U ovom radu korišten je originalan sustav kvasca koji ima unesen gen za $\Delta 12$ desaturazu, koji u inducirajućim uvjetima u mediju s galaktozom proizvodi do 20% PUFA, od čega 12-15% čini za čovjeka esencijalna linolna kiselina.

U prvom djelu rada, cilj je bio ispitati ulogu β -oksidacije u procesu adaptacije na prisutnost PUFA. U tu svrhu korišten je mutant *pox1*, bez funkcionalnog gena za acil-CoA oksidazu, ključnog enzima u ovom procesu, te mutant bez peroksisomalne katalaze A koja je odgovorna za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u inicijalnom koraku β -oksidacije koji katalizira protein Pox1. Kao kontrola korišten je soj bez citoplazmatske katalaze T (*ctt1*). U navedenim mutantima ispitan je utjecaj PUFA na fiziologiju rasta, proizvodnju endogenog ROS-a, indukciju antioksidacijske zaštite (količinu GSH, te aktivnost katalaza i glutation-S-transferaza) te osjetljivost na tretman vodikovim peroksidom. Prisutnosti PUFA u izostanku β -oksidacije, osim u aktivnosti glutation-S-transferaze, nije uzrokovala promjene u izmjerenim parametrima u odnosu na soj BYdesa. Dakle, unatoč mogućoj ulozi β -oksidacije u procesu adaptacije na prisutnost PUFA, ovaj proces nije neophodan stanici kvasca niti u fiziološkim uvjetima niti u uvjetima oksidacijskog stresa.

Međutim, pokazano je da peroksisomalna katalaza A ima ulogu u zaštiti stanice kvasca od oksidacijskih oštećenja u prisutnosti PUFA, budući bez nje dolazi do povećanja proizvodnje endogenog ROS-a, što utječe na sporiji rast i raniji prekid logaritamske faze rasta. Iako je vjerojatni uzrok povećanja endogenog ROS-a vodikov peroksid nastao u procesu β -oksidacije, nije poznato da li je β -oksidacija inducirana u svrhu proizvodnje energije ili regulacije sastava masnih kiselina. Nadalje, soj *cta1*desa pokazao je povećanu proizvodnju ROS-a te povećanu osjetljivost ovisno o tretmanu vodikovim peroksidom, što je vjerojatna

posljedica povećanog endogenog oksidacijskog stresa u prisutnosti PUFA te izostanka povećanja antioksidacijske zaštite (GSH i aktivnosti katalaze). Prisutnost PUFA, u soju bez citoplazmatske katalaze T (*ctl1desa*), nije uzrokovala promjene u mjerenim parametrima u odnosu na soj BYdesa, slično kao i u soju *pox1desa*. S toga, može se zaključiti da peroksisomalna katalaza A ima puno važniju ulogu u zaštiti stanica kvasca tijekom inicijalne adaptacije na prisutnost PUFA na podlozi s galaktozom.

U svrhu potreba metode SGA, konstruiran je soj s kromosomski ugrađenim genom za $\Delta 12$ desaturazu (*Y7092desa*). Funkcionalnost $\Delta 12$ desaturaze ovog soja, potvrđena je analizom sastava masnih kiselina, koji je bio sličan soju s episomalnom ekspresijom $\Delta 12$ desaturaze. Nadalje, u soju *Y7092desa*, napravljena je detaljna kvantifikacija osnovnih razreda glicerolipida i njihovih vrsta, tijekom tri različita vremena od početka akumulacije PUFA u stanici. Ovi eksperimenti su rađeni u svrhu istraživanja putova ugradnje PUFA te adaptivnih odgovora do kojih dolazi na razini metabolizma lipida tijekom prisutnosti PUFA u stanici. Analiza ukupnih količina glicerolipida pokazala je da su PUFA imale minimalan utjecaj na uspostavljenu ravnotežu ukupnih količina analiziranih lipidnih, budući su zabilježene tek manje razlike (10-15%) unutar pojedinih razreda i faza rasta u odnosu na kontrolni soj. Analizom lipidnih vrsta, pokazano je da tijekom sinteze PUFA, u korištenom modelu, dolazi do obogaćivanja glicerolipida Kenedijevog puta (DAG, PC i TAG) vrstama koje sadrže PUFA što je primarno kontrolirano u koraku sinteze DAG. Također, pokazano je da udio vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda PC direktno utječe na povećanje procesa remodeliranja i obrta ovog razreda što je pokazano povećanjem ukupnih količina LPC u soju *Y7092desa*. Zabilježene promjene, koje su se dešavale na razini ukupnih količina te lipidnih vrsta analiziranih razreda glicerolipida, ovisno o vremenu indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu, velikim dijelom su pratila promjene ovisno o fazi rasta, budući je sličan trend promjena zabilježen i u kontrolnom soju. U stacionarnoj fazi, došlo je do snižavanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar PA te većini glicerolipida, što je vjerojatna posljedica iscrpljivanja galaktoze te smanjene indukcije gena za $\Delta 12$ desaturazu.

Suplementacija medija oleinskom kiselinom u prisutnosti galaktoze rezultirala je gotovo dvostrukim povećanjem udjela PUFA (prvenstveno linolne kiseline) u soju *Y7092desa*. Međutim povećani udio PUFA nije promijenio fiziologiju rasta soja *Y7092desa* u odnosu na kontrolni soj. Povećani udio PUFA, u uvjetima suplementacije oleinskom kiselinom, rezultirao je i povećanim udjelima vrsta koje sadrže PUFA unutar većine analiziranih razreda lipida. Najveće povećanje vrsta koje sadrže PUFA zabilježeno je unutar

razreda PE i TAG. U stacionarnoj fazi, zabilježen je trend povećanja udjela vrsta koje sadrže PUFA unutar glicerolipidnih razreda, što je suprotno promjenama kave su bile zabilježene u uvjetima bez suplementacije. Povećanje udjela PUFA u stacionarnoj fazi, u uvjetima suplementacije oleinskom kiselinom, rezultiralo je značajnim povećanjem ukupnih količina TAG (40%), PS(40%) i PA (25%) u odnosu na kontrolni soj. Iako je udio vrsta koje sadrže PUFA unutar razreda TAG ostao na razini prethodne faze, povećana sinteza TAG upućuje na narušenu homeostazu membrana te indukciju sinteze TAG u svrhu izuzimanja PUFA iz sustava bioloških membrana.

Veliki broj sojeva korišten u metodi SGA morao je biti izuzet iz analize kao posljedica slabog rasta jednostrukih mutanata na podlozi s galaktozom. U ostalim mutantima, prisutnost PUFA nije uzrokovala mjerljive promjene u rastu na agaroznim pločama s galaktozom. U uvjetima oksidacijskog stresa, ovisno o tretmanu tBH, identificirano je 217 jednostrukih mutanata koji su pokazali povećanu inhibiciju rasta u prisutnosti PUFA. Identificirani geni grupirani su prema ulozi u staničnim procesima: odgovor na kemijske podražaje, metabolizam ugljikohidrata, odgovor na oksidacijski stres, odgovor na oštećenja DNA, signalne putove, popravak DNA, fosforilaciju proteina, transport iona te endosomalne procese. Također povećanu zastupljenost pokazao je veliki broj gena čija funkcija u stanici nije još dovoljno dobro istražena. Od 217 identificiranih mutanata, koji su pokazali povećanu osjetljivost u uvjetima oksidacijskog stresa, ovisno o prisutnosti PUFA, potvrđeni su fenotipovi 14 sojeva: *GLR1*, *GRX1*, *MXR2*, *TSA2* (stanični odgovor na oksidacijski stres), *RAS1*, *RAS2*, *SRO7*, *LEM3*, *VPS74* (signalni putovi), *BSD2* (transport iona), *RCY1* i *VPS24* (endosomalni transport) te *DNF1* i *LEM3* (transport lipida)

8. SUMMARY

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are essential for maintaining normal structure and function of biological membranes in almost all organisms, including humans. However, under oxidative stress, as a consequence of aberrant aerobic metabolism, PUFAs are prone to degradation by lipid peroxidation (LPO). LPO disrupts biological membranes, while its end products, reactive aldehydes, are involved in many pathological conditions. Yeast (*S. cerevisiae*) presents a good research model, as molecular pathways of lipid and fatty acids metabolism are greatly conserved from yeast to humans. Yeast does not synthesize PUFAs, however yeast is capable for PUFA intake from surrounding media and their incorporation in membrane lipids. Therefore, yeast present excellent conditional system with and without PUFA. This model can be used to study regulation of PUFA metabolism, lipid peroxidation and adaptation induced by those changes for the purpose of understanding pathological processes in eukaryotic cells. In this research, the yeast transformed with gene *fad2* - desaturase that under inducible conditions in medium with galactose produces up to 20% PUFA, including 12-15% of linoleic acid, was used.

First goal of this thesis was to investigate the role of β -oxidation in response to PUFA presence. For this purpose mutant without functional acyl-CoA oxidase (*pox1*), key and rate limiting enzyme of β -oxidation was used, as well as the mutant without functional peroxisomal catalase A (*cta1*), which is responsible for detoxification of hydrogen peroxide formed in the initial step of β -oxidation, catalyzed by Pox1. As a control mutant without cytoplasmatic catalase T (*ctt1*) was used. Influence of PUFA on selected mutants was investigated for growth defects, ROS production, antioxidative defense (GSH, catalase and GST activity) and sensitivity to hydrogen peroxide (H_2O_2) treatment. PUFA presence in mutant without functional β -oxidation (*pox1desa*) did not induce additional changes in all measured parameters compared to *BYdesa*, with exception of changes GST activity. From this data, it can be concluded that even though β -oxidation might be involved in adaptation to PUFA presence, this process is not essential for yeast neither in physiological conditions nor under conditions of oxidative stress.

On the other hand it was shown that peroxisomal catalase A has a role in protection of yeast cell from oxidative damage in PUFA presence. PUFA, without functional catalase A caused increased ROS production which in return influenced slower growth rate and earlier exit from logarithmic phase. Even though the most probable cause of measured increase in ROS was influenced by H_2O_2 produced during β -oxidation, it is not known whether PUFA induced β -oxidation for the purpose of energy production or regulation of fatty acid

composition. Further, *cta1desa* showed increased sensitivity and increased ROS production in dependence to H₂O₂ treatment, which was probably caused by increased endogenous oxidative stress as well as the absence of increased antioxidative defense (GSH and catalase). Similarly to *pox1desa* strain, PUFA presence in the strain without cytoplasmic catalase T (*ctt1desa*) did not cause changes in measured parameters compared to BYdesa. From this data it can be concluded that peroxisomal catalase A has more important role in protection of yeast cells during initial adaptation to PUFA presence on galactose.

For the purpose of SGA, strain with chromosomally integrated gene *foa12* - desaturase was constructed. Functional activity of $\Delta 12$ -desaturase was confirmed by analysis of fatty acid composition, which was similar to strains with episomally expressed *foa12* - desaturase. Further on this strain was also used for detailed quantification of the major glycerolipid classes during three different times after initial PUFA accumulation. This was done to investigate pathways of PUFA incorporation in different lipid classes as well to study adaptive responses at the level of lipid metabolism which were induced by PUFA presence. Analysis of total amounts of different glycerolipid classes showed that PUFA presence caused only minor changes (10-15%) in total amounts of certain lipid classes during different stages of growth. Analysis of lipid species revealed that there is a high increase in PUFA containing species within lipids of Kennedy pathway (DAG, PC and TAG), which is primarily regulated in the step of DAG synthesis. Further, direct correlation between the shares of PUFA species within PC and the increase in total amounts of LPC were shown, which indicated increased PC remodelling and turnover induced by PUFA presence. Observed changes in total amounts and lipid species composition within different lipid classes that were analysed during 3 different times in PUFA presence were similar to those observed in control strain, and were mostly influenced by different stages of growth. In stationary phase, decrease in shares of PUFA species among most of glycerolipid classes was measured, including PA, which can probably be contributed to depletion of galactose and therefore reduced induction of $\Delta 12$ desaturase

Supplementation of galactose medium with oleic acid resulted in almost two fold increase in PUFA production (mostly linoleic acid) in strain Y7092desa. However, increased shares of PUFA did not influence growth compared to control strain, even though there was increased shares of PUFA species among all analysed lipid classes. The most significant increase in PUFA species were measured within PE and TAG. In addition, in the first two growth stages, most of the observed changes were in dependence to different stages of

growth, and were comparable to those in the cells grown only on galactose,. However, in stationary phase there was 40% increase in total TAG production in dependence to increased PUFA shares. Even though the shares of PUFA species within TAG remained at the same level as in the previous growth phase, increased TAG production in this case indicated increased need for removal of PUFAs from biological membranes. In addition to increased TAG, there was also 40% increase of total PS amounts in stationary phase, in response to increased PUFA production.

Large number of strains, used in SGA had to be excluded from analysis as a result of poor growth of single deletion mutants on galactose. Further on, PUFA presence alone did not cause any additional changes in growth of single mutant collection on agar plates with galactose. However in the conditions of oxidative stress, in dependence to tBH treatment, 217 single mutants in the presence of PUFA showed inhibition of growth. Identified genes were sorted according to cellular processes: response to chemical stimuli, carbohydrate metabolism, response to oxidative stress, response to DNA damage, signalling, DNA repair, protein phosphorylation, ion transport and endosomal processes. In addition, large number of genes that are still not annotated showed higher frequency among group cluster compared to genome frequency. From 217 identified single mutants that showed increased sensitivity to oxidative stress in PUFA presence, so far, observed phenotype was confirmed for 14 strains. Confirmed genes are involved in response to oxidative stress (*GLR1*, *GRX1*, *MXR2*, *TSA2*), signalling (*RAS1*, *RAS2*, *SRO7*, *LEM3*, *VPS74*), ion transport (*BSDA2*), endosomal transport (*RCY1*, *VPS24*). Interestingly, proteins encoded by genes *DNF1* and *LEM3*, are directly involved in transversal flop of lipids from outer layer of membrane to inner cytoplasmatic layer, which indicates importance of this process in maintenance of membrane homeostasis in conditions of oxidative stress in PUFA presence.

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Luka Andrišić

Datum rođenja: 09. Listopada 1979.

Mjesto rođenja: Osijek, Hrvatska

Adresa: Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Telefon / Fax: +385 (01) 457 1212 / +385 (01) 456 1010

e-mail: landris@irb.hr

Titula: inženjer biologije, smjer: molekularna biologija

EDUKACIJA

- 1999. – 2006. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, studij Molekularna biologija
- srpanj 2006., Diplomski rad, Laboratorij za molekularnu genetiku, Institut Ruđer Bošković
- 2007. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski rad "Molekularne bioznanosti", Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku i Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

•

STIPENDIJE I INOZEMNI BORAVCI

- lipanj 2008. kratkotrajna znanstvena misija (STSM) u sklopu akcije COST B35 "Lipid Peroxidation Associated Disorders: LPO", Zavod. za patološku biokemiju, Medicinski fakultet Otto von Guericke, Magdeburg, Njemačka, domaćin Dr. Ingrid Wiswedel
- 01.04.2012.-30.06.2012. Studijski boravak na osnovu dodijeljene stipendije od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) u sklopu programa „Stipendija za doktorande“, „Institute of Molecular Biosciences, Lipidomics Research Center Graz“, Sveučilište u Grazu, Graz, Austrija, domaćin Prof. Sepp D. Kohlwein.

TREKUTNO ZAPOSLENJE

- lipanj 2007., znanstveni novak u Laboratoriju za Oksidacijski stres na projektu 098-0982464-2519 - Lipidi, slobodni radikali i njihovi glasnici u integrativnoj onkologiji, voditelj znanstveni savjetnik dr.sc. Neven Žarković, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković.

PUBLIKACIJE

- 8 originalnih znanstvenih radova u časopisima koje navodi Current Contents
- 4 znanstvena priopćenja na nacionalnim i međunarodnim znanstvenim skupovima

ČLANSTVO U STRUČNIM I ZNANSTVENIM UDRUGAMA

- Hrvatsko društvo za istraživanje raka(HDIR),
- The European Association for Cancer Research (EACR)
- The International HNE-Club
- Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB)

ZNANSTVENI RADOVI (CC):

1. Fenzl, V; Flegar-Meštrić, Z; Perkov, S; Andrišić, L; Tatzber, F; Zarković, N; Duić, Z. Trace elements and oxidative stress in hypertensive disorders of pregnancy. // Archives of Gynecology and Obstetrics (2012).
2. Špoljarić, Dubravka; Čipak, Ana; Horvatić, Janja; Andrišić, Luka; Waeg, Georg; Žarković, Neven; Jaganjac, Morana. Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga *Chlorella kessleri* acts as a bioactive indicator of pollution with common herbicides and growth regulating factor of hormesis. // Aquatic toxicology. 105 (2011) 552-558.
3. Antončić-Svetina, Maja; Šentija, Davor; Čipak, Ana; Miličić, Davor; Meinitzer, Andreas; Tatzber, Franz; Andrišić, Luka; Zelzer, Sieglinde; Žarković, Neven. Ergometry Induces Systemic Oxidative Stress in Healthy Human Subjects. // Tohoku journal of experimental medicine. 221 (2010) 43-48.
4. Šverko, Ana; Sobočanec, Sandra; Kušić, Borka; Mačak-Šafranko, Željka; Šarić, Ana; Leniček, Tanja; Kraus, Ognjen; Andrišić, Luka; Korolija, Marina; Balog, Tihomir; Borović, Suzana; Marotti, Miljenko. Superoxide dismutase and cytochrome P450 isoenzymes might be associated with higher risk of renal cell carcinoma in male patients. // International Immunopharmacology. 11 (2011) 639-645.
5. Breusing, Nicolle; Grune, Tilman; Andrišić, Luka; Atalay, Mustafa; Bartosz, Grzegorz; Biasi, Fiorella; Borović, Suzana; Bravo, Laura; Casals, Isidre; Casillas, Rosario; Dinischiotu, Anca; Drzewinska, Joanna; Faber, Heidemarie; Mohd Fauzi, Norsyahida; Gajewska, Agnieszka; Gambini, Juan; Gradinaru, Daniela; Kokkola, Tarja; Lojek, Antonin; Luczaj, Wojciech; Margina, Denisa; Mascia, Cinzia; Mateos, Raquel; Meinitzer, Andreas; Mitjavila, María Teresa; Mrakovčić, Lidija; Munteanu, Maria Cristina; Podborska, Martina; Poli, Giuseppe; Sicinska, Paulina; Skrzydlewska, Elzbieta; Vina, Jose; Wiswedel, Ingrid; Žarković, Neven; Zelzer, Sieglinde; Spickett, Corinne M. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. // Free radical research. 44 (2010) 1203-1215.
6. Casós, Kelly; Zaragoza, María C.; Žarković, Neven; Žarković, Kamelija; Andrišić, Luka; Portero-Otín, Manuel; Cacabelo, Daniel; Mitjavila, María T. A fish oil-rich diet reduces vascular oxidative stress in apoE^{-/-} mice. // Free radical research. 44 (2010) 821-829.
7. Gverić-Ahmetašević, Snježana; Borović Šunjić, Suzana; Skala, Hana; Andrišić, Luka; Štroser, Marina; Žarković, Kamelija; Škrablin, Snježana; Tatzber, Franz; Čipak, Ana; Jaganjac, Morana; Gverić, Tugomir; Žarković, Neven. Oxidative stress in small-for-gestational age (SGA) term newborns and their mothers. // Free radical research. 43 (2009) 376-384.
8. Štefanić, Zoran; Vujaklija, Dušica; Andrišić, Luka; Mikleušević, Goran; Andrejašić, Miha; Turk, Dušan; Luić, Marija. Preliminary crystallographic study of *Streptomyces coelicolor* single-stranded DNA-binding protein. // Croatica Chemica Acta. 80 (2007) 35-39.

PREGLEDNI RADOVI:

1. Wildburger, Renate; Mrakovčić, Lidija; Štroser, Marina; Andrišić, Luka; Borović Šunjić, Suzana; Žarković, Kamelija; Žarković, Neven. Peroxidation and Age-Associated Diseases-Cause or Consequence?. // Türkiye Klinikleri = Journal of Medical Sciences. 29 (2009) 189-193.

SAŽECI U ZBORNICIMA SKUPOVA:

1. Andrišić, Luka; Perak, Eleonora; Kohlwein, Sepp D.; Tehlivets, Oksana; Žarković, Neven ; Čipak Gašparović, Ana. Adaptation to oxidative stress in $\Delta 12$ desaturase expressing yeast // HDIR-1: Prva konferencija hrvatskog društva za istraživanje raka, 11. studeni 2010. Zagreb, Hrvatska (poster, zbornik sažetaka).

2. Andrišić, Luka, Borović Sunjić, Suzana, Mrakovčić, Lidija, Waeg, Georg, Guearard, Francoise, Žarković, Neven. HNE-ELISA: detecting lipid peroxidation in biological systems //HNE-meeting : "Lipid Oxidation, Human Diseases, and Aging", 16.-18.06.2010. Torino, Italija (poster, međunarodna recenzija, izabrano kratko predavanje, zbornik sažetaka).

3. Čipak, Ana; Hasslacher, Meinhard; Andrišić, Luka; Jaganjac, Morana; Collinson, Emma J.; Tehlivets, Oksana; Dawes, Ian W.; Kohlwein, Sepp D.; Žarković, Neven. Adaptation to oxidative stress mediated by catalase in $\Delta 12$ desaturase expressing yeast HNE-meeting // HNE-meeting : "Lipid Oxidation, Human Diseases, and Aging", 16.-18.06.2010. Torino, Italija (zbornik sažetaka).

4. Katušić, Ana; Bulić-Jakuš, Floriana; Žarković, Kamelija; Čipak, Ana; Andrišić, Luka; Šerman, Ljiljana; Vlahović, Maja; Sinčić, Nino; Žarković, Neven. Immunohistochemical expression of HNE-protein conjugates in rat experimental teratoma // Abstracts of the Inter-Domain & Inter-Action COST Meeting "Oxygen, Stress and Lipids" Inter-Domain & Inter-Action COST Meeting "Oxygen, Stress and Lipids" Mjesto i datum: 26-27.10.2007. Dubrovnik, Hrvatska, (poster, zbornik sažetaka).