

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Katja URŠIČ

**VLOGA PROTEINA Tum1 V LIPIDNEM
METABOLIZMU KVASOVKE**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij 2. stopnja)

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Katja URŠIČ

**VLOGA PROTEINA Tum1 V LIPIDNEM METABOLIZMU
KVASOVKE**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij 2. stopnja)

**THE ROLE OF Tum1 PROTEIN IN THE LIPID METHABOLISM OF
YEAST**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaklju ek Univerzitetnega študija II. Bolonjske stopnje Molekulska in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Oddelku za Molekularne in biomedicinske znanosti Instituta Joflef Stefan.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senat oddelka je dne 20. 2. 2015 odobrila naslov magistrske naloge. Za mentorja magistrskega dela je bil imenovan izr. prof. dr. Uro-Petrovi , za recenzenta pa doc. dr. Matej Butala.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: izr. prof. dr. Uro-Petrovi
Institut Joflef Stefan, Oddelek za molekularne in biomedicinske znanosti

Recenzent: doc. dr. Matej Butala
Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 8. 9. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identen tiskanemu. Na univerzo neodpla no, neizklju no, prostorsko in asovno neomejeno prena-am pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogo anja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjiifnice Biotehni-ke fakultete.

Katja Ur-i

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

TID Du2

DK 577:582.282(043.2)=163.6

KG kvasovka/lipidi/tRNA/tiolacija/homologija

AV UR^{TIF}, Katja, diplomirana biologinja (UN)

SA PETROVI, Uro-

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehni-ka fakulteta

LI 2015

IN VLOGA PROTEINA Tum1 V LIPIDNEM METABOLIZMU KVASOVKE

TD Magistrsko delo (Magistrski -tudij ó 2. stopnja)

OP XV, 72 str., 22 pregl., 28 sl., 2 pril., 163 vir.

IJ SI

JI sl/en

AI V magistrski nalogi smo raziskali kvasni *TUM1*, gen, katerega sesalski homolog *TST* je bil opisan kot soudelefen pri metabolizmu lipidov. Zanimalo nas je, ali ima protein Tum1 vpliv na metabolizem lipidov v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in kak-en je mehanizem tega vpliva. Odkrili smo, da protein Tum1 vpliva na metabolizem lipidov saj njegova odsotnost povzro i pove ano vsebnost sterolnih estrov v kvasovkah. Edina do danes opisana biolo-ka vloga Tum1 je tiolacija ohlapnega uridina molekule tRNA, kjer s proteini Uba4, Ncs2, Ncs6 in Nfs1 sestavlja biokemijsko pot URM1. V tej biokemijski poti se tiolira ohlapni uridin treh molekul tRNA, specifi nih za glutamin (tQ^{UUG}), lizin (tK^{UUU}) oziroma glutaminsko kislino (tE^{UUC}). Potrdili smo sintezo mi-jega proteina Tst v kvasni celici. Nato smo z analizo tiolacije molekul tRNA pokazali, da Tst ne nadomesti Tum1 v biokemijski poti URM1. Lipidna analiza seva kvasovke z izbranim genom za protein Uba4 in seva s prekomerno izraflenimi zgoraj omenjenimi tRNA molekulami je pokazala, da biokemijska pot URM1 ni vpletena v metabolizem lipidov. Ugotovili smo, da Tum1 ne vpliva na metabolizem lipidov preko biokemijske poti URM1, temve preko druge, -e neznane poti. Za preveritev hipoteze, da sta *TUM1* in *TST* funkcijska homologa, pa so potrebni dodatni eksperimenti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC 577:582.282(043.2)=163.6
CX yeast/lipids/tRNA/thiolation/homology
AU UR^T , Katja
AA PETROVI , Uro-
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty
PY 2015
TI THE ROLE OF Tum1 PROTEIN IN THE LIPID METHABOLISM OF YEAST
DT M. Sc. Thesis (Master's Study Programme)
NO XV, 86 p., 22 tbl., 28 fig., 2 ann., 163 ref.
LA SI
AL sl/en
AB We have been studying the yeast gene *TUM1* whose mammal homologue gene *TST* was described as involved in the lipid metabolism. The purpose of the Master's Thesis was to investigate the possible role of Tum1 in lipid metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* and its mechanism of action in this process. We found that Tum1 is involved in lipid metabolism as its absence causes an increase in the content of sterol esters. The only hitherto known biological role of Tum1 was involvement in the tRNA wobble uridine modification URM1 pathway, consisting also of Uba4, Ncs2, Ncs6 and Nfs1 proteins. This pathway is required for thiolation of three tRNAs specific for glutamine (tQ^{UUG}), lysine (tK^{UUU}), and glutamic acid (tE^{UUC}). These tRNAs have the 2-thiouridine derivative as the wobble nucleoside. We confirmed expression of the mouse protein Tst in the yeast cell. We then demonstrated that *TUM1* deficiency cannot be complemented by Tst in the URM1 thiolation pathway. The lipid analysis of the cells lacking Uba4 and over-expression of the above-mentioned tRNAs indicated that the URM1 pathway is not involved in lipid metabolism. We established that Tum1 does not affect lipid metabolism through the URM1 pathway, but through a currently unknown pathway. Additional experiments are needed to test functional homology of *TST* and *TUM1*.

KAZALO VSEBINE

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
OKRAJMAVE IN SIMBOLI	XIII
OKRAJMAVE AMINOKISLIN	XV
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM	3
2.1.1 Nadome- anje kvasnih genov z geni sesalcev	4
2.1.1.1 Ortologija in paralogija	4
2.1.1.2 Humanizacija kvasnih genov	5
2.2 SESALSKA PROTEINA Tum1 (<i>Homo sapiens</i>) IN Tst (<i>Mus musculus</i>)	6
2.2.1 Funkcija sesalskih proteinov Tst in Tum1	7
2.3 GEN <i>TUM1</i> (<i>YOR251c</i>) IN PROTEIN Tum1 KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.3.1 Zgradba proteina Tum1	7
2.3.2 Funkcija proteina Tum1	9
2.3.2.1 Prena-alna RNA (tRNA)	9
2.3.2.2 Tiolacija ohlapnega uridina prena-alne RNA	10
2.3.2.3 Mehanizem tiolacije ohlapnega uridina prena-alne RNA	11
2.3.2.4 Druge funkcije proteina Tum1	13
2.3.3 Lokalizacija proteina Tum1	14
2.4 LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.4.1 Ma- obne kisline	15
2.4.2 Membranski lipidi	16
2.4.2.1 Fosfolipidi	16

2.4.2.2 Sfingolipidi	16
2.4.2.3 Metabolizem sterolov	16
2.4.3 Nepolarni lipidi	17
2.4.3.1 Metabolizem sterolnih estrov	19
2.4.3.2 Metabolizem triacilglicerolov	19
2.5 POMEN POZNAVANJA LIPIDNEGA METABOLIZMA KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.5.1 Lipidi in zdravje	20
3 METODE IN MATERIALI	22
3.1 MATERIALI	22
3.1.1 Laboratorijska oprema in potro-ni material	22
3.1.2 Kemikalije	23
3.1.3 Rastopine in pufri	24
3.1.4 Komercialni kompleti reagentov	25
3.1.5 Plazmidni vektorji	25
3.1.6 Genski zapisi	26
3.1.7 Encimi	26
3.1.8 Za etni oligonukleotidi	26
3.1.9 Organizmi	27
3.1.9.1 Sevi kvasovk	27
3.1.9.2 Bakterijski sevi	28
3.1.10 Elektroforezni standardi	28
3.1.11 Goji- a	28
3.1.11.1 Goji- a za kvasovke	28
3.1.11.2 Goji- a za bakterije	29
3.1.12 Protitelesa	29
3.1.13 Homogenati	29
3.1.14 Antibiotiki	29
3.1.15 Ra unalni-ki programi	30
3.2 METODE	30
3.2.1 Sterilizacija steklovine, goji- in raztopin	30

3.2.2 Priprava goji-	30
3.2.2.1 Goji- a za rast bakterij	30
3.2.2.2 Goji- a za rast kvasovk	31
3.2.3 Delo z bakterijami	31
3.2.3.1 Gojenje in vzdrfevanje bakterijskih celic	31
3.2.4 Delo s kvasovkami	31
3.2.4.1 Gojenje in vzdrfevanje kvasne kulture	31
3.2.4.2 Merjenje opti ne gostote kvasne kulture	32
3.2.4.3 Meritev hitrosti rasti kvasnih celic ali izdelava rastnih krivulj	32
3.2.4.4 Preverjanje uspe-nosti rasti sevov kvasovk na trdnem goji- u z oleatom	32
3.2.5 Osnovne metode molekulskega kloniranja	33
3.2.5.1 Izolacija genomske DNA iz kvasovk	33
3.2.5.2 Izolacija plazmidne DNA iz kvasovk	33
3.2.5.3 Izolacija plazmidne DNA iz bakterij	33
3.2.5.4 Dolo anje koncentracije DNA	34
3.2.5.5 Pomnofevanje DNA z verifno reakcijo s polimerazo (PCR)	34
3.2.5.6 Agarozna gelska elektroforeza (AGE)	35
3.2.5.7 i- enje fragmentov DNA iz agaroznega gela	35
3.2.5.8 Transformacija kvasnih celic z metodo z litijevim acetatom	36
3.2.5.9 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic	36
3.2.5.10 Preverjanje nukleotidnega zaporedja	37
3.2.5.11 Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami	37
3.2.5.12 Ligacija	37
3.2.5.13 Konstrukcija plazmida <i>in silico</i> z uporabo programa ApE	38
3.2.6 Priprava seva BY4741 <i>tum1Δ mfa1::GAL1pr-TST-NatMX</i> z metodami molekulskega kloniranja	38
3.2.7 Priprava seva BY4741 <i>tum1Δ::TST</i> z metodami molekulskega kloniranja	39
3.2.8 Priprava plazmida pCAU-<i>TST</i> z metodami molekularnega kloniranja	40
3.2.9 Dolo anje vsebnosti lipidov v celicah kvasovke	40
3.2.9.1 Nile red metoda	40
3.2.9.2 Dolo anje vsebnost lipidov s tankoplastno kromatografijo	41

3.2.10 Delo s tRNA	42
3.2.10.1 Izolacija tRNA iz kvasovk	42
3.2.10.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajo ih pogojih v prisotnosti uree in akrilaminofenilffivosrebrovega klorida	43
3.2.11 Izolacija proteinov iz kvasovk in prenos western	44
3.2.11.1 Izolacija proteinov iz kvasovk	44
3.2.11.2 Dolo anje koncentracije proteinov	44
3.2.11.3 NaDS-poliakrilamidna elektroforeza (NaDS-PAGE)	44
3.2.11.4 Barvanje proteinov s Coomassie modrim	45
3.2.11.5 Prenos western	45
3.2.12 Svetlobna mikroskopija	46
3.2.13 Statisti na obdelava podatkov	46
4 REZULTATI	47
4.1 MITMI PROTEIN Tst LAHKO SINTETIZIRAMO V KVASOVKI <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4.1.1 Detekcija proteina Tst s NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo in prenosom western	47
4.2 OLEAT NE INHIBIRA RASTI MUTANT V BIOKEMIJSKI POTI URM1	49
4.2.1 Oleatni test	49
4.3 PROTEIN Tum1 VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.3.1 Analiza Nile red	50
4.3.1.1 Analiza vsebnosti lipidov v haploidnih sevov	51
4.3.1.2 Analiza vsebnosti lipidov v diploidnih sevih	52
4.3.3 Raven izraflanja gena <i>TUM1</i> oziroma gena <i>TST</i> vpliva na vsebnost lipidov v kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	53
4.3.3.1 Delecija gena <i>TUM1</i> vpliva na vsebnost sterolnih estrov v kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	53
4.3.3.2 Vpliv vstavitve mi-jega gena <i>TST</i> v genom kvasovke <i>S. cerevisiae</i> pod nativni promotor <i>TUM1</i> pr na lipidni metabolizem	54
4.3.3.3 Vpliv izraflanja mi-jega gena <i>TST</i> oziroma kvasnega gena <i>TUM1</i> na plazmidu pod promotorjem <i>ADH1</i> pr na lipidni metabolizem	54
4.4 PROTEIN Tum1 NE VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PREKO TIOLACIJE tRNA	57

4.4.1 Proteina Tum1 in Uba4 sta udeležena pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA	57
4.4.2 Vsebnost lipidov v delecijem sevu <i>uba4Δ</i> je enaka kot v divjem tipu BY4741	59
5 RAZPRAVA	61
5.1 MI TM PROTEIN T st LAHKO SINTETIZIRAMO V KVASOVKI <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
5.2 RAST SEVOV, UDELEŽENIH V BIOKEMIJSKI POTI URM1 KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , JE ENAKA NA GOJI TM U YPD IN OLEATNEM GOJI TM U62	
5.3 NIVO IZRAFIANJA KVASNEGA GENA <i>TUM1</i> OZIROMA MI TM JEGA GENA <i>TST</i> VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	63
5.3.1 Metoda Nile red	63
5.3.2 Z metodo TLC zaznamo razlike v vsebnosti lipidov med preiskovani sevi	64
5.3.2.1 Delecija <i>TUM1</i> vpliva na vsebnost sterolnih estrov v kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	64
5.3.2.2 Vpliv integracije mi-jega gena <i>TST</i> v genom kvasovke <i>S. cerevisiae</i> na lipidni metabolizem	64
5.4 PROTEIN Tum1 NE VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM PREKO TIOLACIJE tRNA	65
5.5 PREKOMERNO IZRAFIANJE TREH VRST tRNA (tQ ^{UUG} , TK ^{UUU} in tE ^{UUC}) V DELECIJSKIH SEVIH <i>tum1Δ</i> in <i>uba4Δ</i> NE VRNE LIPIDNEGA FENOTIPA NA NIVO DIVJEGA TIPRA	67
5.6 PREDPOSTAVLJEN MEHANIZEM VPLIVA KVASNEGA PROTEINA Tum1 NA LIPIDNI METABOLIZEM	67
6 SKLEPI	70
7 POVZETEK	71
8 VIRI	73

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljena laboratorijska oprema in potro-ni material ter proizvajalec materiala.	22
Pregl. 2: Uporabljene kemikalije in proizvajalec kemikalij.	23
Pregl. 3: Raztopine in pufri uporabljeni v magistrskem delu.	24
Pregl. 4: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti reagentov in njihov proizvajalec.	25
Pregl. 5: Uporabljeni plazmidni vektorji.	25
Pregl. 6: Uporabljeni genski zapisi.	26
Pregl. 7: Uporabljeni encimi.	26
Pregl. 8: Uporabljeni sevi kvasovk.	27
Pregl. 9: Uporabljeni bakterijski sevi.	28
Pregl. 10: Uporabljeni elektroforezni standardi.	28
Pregl. 11: Uporabljena goji- a za rast kvasovk.	28
Pregl. 12: Uporabljena goji- a za rast bakterij.	29
Pregl. 13: Uporabljena protitelesa.	29
Pregl. 14: Uporabljeni homogenati.	29
Pregl. 15: Uporabljeni antibiotiki	29
Pregl. 16: Uporabljeni ra unalni-ki programi.	30
Pregl. 17: Reakcijska zmes za verifno reakcijo z DNA polimerazo Q5®.	34
Pregl. 18: Temperaturni in asovni profil verifne reakcije z DNA polimerazo Q5®.	34
Pregl. 19: Reakcijska zmes za verifno reakcijo z DNA polimerazo Taq.	35
Pregl. 20: Temperaturni in asovni profil verifne reakcije z DNA polimerazo Taq.	35
Pregl. 21: Vzbujanje in emisija pri metodi Nile red.	41
Pregl. 22: Uporabljeni sevi za analizo vsebnosti lipidov z Nile red.	51

KAZALO SLIK

Sl. 1: Sistemati no nadome- anje esencialnih kvasnih genov z njihovimi love-kimi homologi.	5
Sl. 2: Strukturno prileganje proteina Tum1 kvasovke <i>S. cerevisiae</i> in njegovih homologov.	6
Sl. 3 in Sl. 4: Tridimenzionalna zgradba kvasnega proteina Tum1.	8
Sl. 5: Nepojasnjena elektronska gostota v bliflini aktivnega mesta proteina Tum1.	9
Sl. 6: Spremenjeni ohlapni uridini, prisotni v tRNA kvasovk.	11
Sl. 7: Model mehanizma z Urm1 posredovane tiolacije ohlapnega uridina.	13
Sl. 8: Metabolizem nepolarnih lipidov v kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	18
Sl. 9: Spektralne lastnosti barvila Nile red v prisotnosti triacilgliceridov in fosfolipidov.	41
Sl. 10: Sestava aparature za izvedbo prenosa western.	45
Sl. 11: Lo evanje mi-jih in kvasnih proteinov z NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo.	48
Sl. 12: Prenos western s primarnimi protitelesi proti mi-jemu proteinu Tst.	48
Sl. 13: Oleatni test z mutantami v biokemijski poti URM1.	49
Sl. 14: Kontrola za oleatni test z mutantami v biokemijski poti URM1.	50
Sl. 15: Kontrola metode z barvilom Nile red za analizo lipidov.	51
Sl. 16: Analiza vsebnosti lipidov haploidnih sevov kot dolo eno z analizo z barvilom Nile red.	52
Sl. 17: Nile red analiza vsebnosti lipidov v dipodinih sevih.	52
Sl. 18: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, pri dvijem tipu BY4741 (WT), delecijem sevu BY4741 <i>tum1Δ</i> (<i>tum1Δ</i>) in v sevu BY4741 <i>tum1Δ</i> , v katerega je bil vrnjen gen <i>TUM1</i> (<i>tum1Δ::TST</i>).	53
Sl. 19: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, pri divjem tipu (WT), <i>TUM1</i> delecijem sevu (<i>tum1Δ</i>) in v <i>TUM1</i> delecijem sevu, v katerega je bil vstavljen <i>TST</i> (<i>tum1Δ::TST</i>).	54
Sl. 20: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 z genom <i>TUM1</i> pod uravnavo <i>ADH1pr</i> na plazmidu (WT [<i>ADH1pr-TUM1</i>]).	55
Sl. 21: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v delecijem sevu BY4741 <i>tum1Δ</i> s komplementacijo <i>TUM1</i> pod kontrolo <i>ADH1pr</i> na plazmidu ([<i>ADH1pr-TUM1</i>]).	55

- Sl. 22: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 z genom *TUM1* pod uravnavo *ADH1pr* na plazmidu (WT [*ADH1pr-TST*]). 56
- Sl. 23: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v delecijem sevu BY4741 *tum1Δ* z genom *TST* pod uravnavo *ADH1pr* na plazmidu (*tum1Δ* [*ADH1pr-TST*]). 56
- Sl. 24: Lo ba molekul tRNA sevov divjega tipa BY4741 (WT) in delecijem sevov BY4741 *uba4Δ* in BY4741 *tum1Δ* na urea-poliakrilamidnem gelu z APM. 58
- Sl. 25: Lo ba molekul tRNA sevov divjega tipa BY4741 (WT [*ADH1pr*]) in delecijem sevov BY4741 *tum1Δ* s plazmidom [*ADH1pr*], [*ADH1pr-TUM1*] ali [*ADH1pr-TST*] na urea-poliakrilamidnem gelu z APM. 58
- Sl. 26: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 (WT) in delecijem sevov BY4741 *tum1Δ* ter BY4741 *uba4Δ*. 59
- Sl. 27: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 (WT) in delecijem sevov BY4741 *tum1Δ* ter BY4741 *uba4Δ* ob prekomernem izraflanju treh specifi nih vrst tRNA. 60
- Sl. 28: Predpostavljen mehanizem delovanja proteina Tum1. 68

OKRAJMAVE IN SIMBOLI

aa-tRNA	aminoacil tRNA
acetil-CoA	acetil koencim A
AGE	agarozna gelska elektroforeza
AK	aminokislina
ampR	odpornost proti ampicilinu
AS	amonijev sulfat
ATP	adenozin trifosfat (ang. »adenosine triphosphate«)
APM	akrilaminofenilflivosrebrov klorid (ang. »acryloylaminophenylmercuric chloride«)
bp	bazni par
cDNA	komplementarna DNA (ang. »complementary DNA«)
clonNAT	nourseotricin N-acetil-transferaza (<i>NatMX</i>)
Da	dalton
dH ₂ O	destilirana voda
DH5	kompetentne bakterijske celice
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid (ang. »deoxynucleotide«)
FL	fosfolipidi
G418	geneticin G418 disulfat (<i>KanMX</i>)
GFP	zeleni fluorescirajo i protein (ang. »green fluorescen protein«)
kbp	kilobazni par
MK	ma- obne kisline
MQ	milli-Q voda (dodatno o i- ena deionizirana voda)
mt-tRNA	mitohondrijska tRNA
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NR	barvilo (ang. »Nile red«)
OD	opti na gostota (ang. »optical density«)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. »polyacrylamide gel electrophoresis«)
PCR	verifna reakcija s polimerazo (ang. »polymerase chain reaction«)
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	obrati na minuto (ang. »revolutions per minute«)
SE	sterolni estri
SKO	zbirka viabilnih enojnih delecijjskih mutant kvasovke (ang. »single knockout collection«)
SL	sfingolipidi
ss-DNA	enoverifna DNA (ang. »single stranded DNA«)
ST	sobna temperatura

TAE	tris-acetat-EDTA
TAG	trialciglicerol
TBS	tris puferna solna raztopina
TG	triacilglicerid
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. »thin layer chromatography«)
T _m	talilna temperatura (ang. »melting temperature«)
Tst	protein Tst (ang. »thiosulfate sulfurtransferase«)
Tum1	protein Tum1 (ang. »tRNA thiouridin modification protein 1«)
tRNA	prena-alna RNA (ang. »messenger RNA«)
UV	ultravijoli na svetloba
WB	prenos western
WT	divji tip (ang. »wild type«)

OKRAJ^TA VE AMINOKISLIN

C	Cys	cistein
D	Asp	aspartat
E	Glu	glutamat
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin

1 UVOD

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je zaradi dobro ohranjenih mehanizmov, podobnih drugim evkariontom, zaradi dostopnosti delecijjskih mutant, ki odraflajo spremembe v metabolnih poteh lipidov, in zaradi relativno enostavnega rokovanja postala zanesljiv modelni organizem za raziskave na podro ju biokemije, molekularne biologije in celi ne biologije lipidov (Winzeler in sod., 1999; Klug in sod., 2014; Daum in sod., 2014). Prednosti, ki jih ima kvasovka *S. cerevisiae* kot modelni organizem, so pripeljale do eksperimentov, s katerimi posku-amo z nadome-anjem kvasnih genov s sesalskimi ortologi raziskati njihovo funkcijo. Biosinteza in shranjevanje nepolarnih lipidov, kot so triacilgliceroli in sterolni estri, sta zaradi napak v procesih, ki se pri loveku kafejo kot bolezn, v zadnjih desetletjih predmet vedno ve ih raziskav (Koch in sod., 2014). Lipidi kvasovke so pomembni tudi z vidika biotehnologije in sicer za produkcijo industrijsko in farmacevtsko pomembnih lipidnih molekul (Uemura, 2012).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Na-a raziskovalna skupina se ukvarja z raziskovanjem nepoznanih produktov genov, ki sodelujejo pri metabolizmu lipidov. V magistski nalogi smo raziskali kvasni *TUM1*, gen, katerega sesalski homolog *TST* je bil opisan kot soudelefen pri metabolizmu lipidov (Horvat, neobjavljeno). O proteinu Tum1 ne vemo veliko. Njegova do danes edina znana biolo-ka vloga, sodelovanje pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA, se ne dotika metabolizma lipidov (Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009). Priprava delecijjskih sevov in vstavljanje specifi nih genskih zapisov brez lastnih promotorjev pod uravnavo razli no aktivnih promotorjev, tako v genom kvasovke kot tudi na plazmidne DNA, nam skupaj z drugimi molekularnimi tehnikami danes omogo a raziskovanje vpletenosti genov oziroma proteinov v metabolizmu lipidov in odkrivanje mehanizmov njihovega delovanja. Slednje tehnike smo uporabili za preu itev produkta gena *TUM1*.

1.2 NAMEN DELA

- Ugotoviti, ali ima protein kvasovke Tum1 vpliv na metabolizem lipidov.
- Primerjati vpliv sinteze rekombinantenga proteina Tst oziroma proteina Tum1 na metabolizem lipidov kvasovke.
- Raziskati povezavo med specifi no modifikacijo (tiolacijo) tRNA molekul in uravnavanjem lipidnega metabolizma pri evkariontih, na primeru kvasovke in proteina Tum1.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- I. Protein Tum1 vpliva na vsebnost lipidov kvasovke *S. cerevisiae*.

- II. Sesalski *TST* in *TUM1* kvasovke sta homologna gena, katerih produkta imata ohranjeno funkcijo.
- III. Protein Tum1 s tiolacijo tRNA vpliva na lipidni metabolizem kvasovke.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM

Kvasovko *S. cerevisiae* uporabljamo pri izdelavi kruha, vina in piva fe od anti ne dobe (Botstein in sod., 1997). V zadnjih desetletjih pa je postala pomemben modelni organizem za raziskovanje osnovnih celi nih procesov kot so podvajanje DNA, celi na delitev, zvijanje proteinov, metabolizem in znotrajceli ni transport. Ti celi ni procesi so pri kvasovkah evlucijsko relativno dobro ohranjeni in tako podobni pri kvasovkah in pri vi-jih evkariontih, vklju no s sesalci (Fields in Johnston, 2005). Zato je lahko znanje o ohranjenih celi nih mehanizmih, kot sta uravnavanje celi nega cikla in staranje celice, po tem, ko je pojasnjeno na kvasovki, neposredno uporabljeno na nivoju sesalskega sistema. Rezultati raziskav kvasovke tako igrajo pomembno vlogo pri razumevanju kompleksnih procesov in tudi bolezn loveka (Hartwell, 2002; Nurse, 2002; Blackburn, 2010; Szostak, 2010).

Lastnosti, ki kvasovko *S. cerevisiae* naredijo dober modelni organizem za biolo-ke raziskave, so naslednje:

1. Kvasovka *S. cerevisiae* je enoceli en mikroorganizem. Gojenje in vzdrfevanje kvasne kulture je preprosto in hitro. Poteka na trdnih ali v teko ih medijih, ki so cenovno ugodni in omogo ajo izvajanje kontroliranih eksperimentov pri razli nih pogojih. Ob optimalnih pogojih traja celi ni cikel 90 minut.
2. Kvasovka lahko raste in se deli kot haploid ali diploid. Kvasovka *S. cerevisiae* se tako lahko razmnofluje spolno ali nespolno (brstenje), kar v splo-nem olaj-a genetsko spreminjanje in raziskovanje. Preprosto je zdruffiti dva haploidna seva ali povzro iti sporulacijo diploidnega seva, s imer lahko izvedemo klasi en genetskih test (Melese in Hieter, 2002).
3. Dostopna je zbirka enojnih mutant diploidnih in haploidnih kvasnih celic.
4. Kvasni genom je bil prvi popolnoma sekvenciran evkariontski genom (Goffeau in sod., 1996). Sekvenciranje je omogo ilo razvoj -tevilnih visoko zmogljivih *in vivo* genomskih tehnik v kvasovkah. Danes je funkcionalno karakteriziranih okoli 5129 od 6604 odprtih bralnih okvirjev kvasnega genoma (*Saccharomyces* genome database).
5. Na spletu najdemo kar nekaj prosto dostopnih podatkovnih zbirk o kvasovkah. Glavna podatkovna zbirka je *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (www.yeastgenome.org). V njej je sistemati no shranjeno vse znanje o *S. cerevisiae*. Predstavljeni so tudi podatki o predvidenih ortologih vseh kvasnih genov v drugih organizmih. Poleg tega so prosto dostopna tudi orodja za analizo podatkov visoko zmogljivih raziskav na nivoju genomov (transkriptomske, proteomske in interaktomske -tudije).

6. V kvasovki lahko sproffimo izraflanje heterolognih genov. Slednji se lahko nahajajo na episomalnem plazmidnem vektorju, ali pa so integrirani v kromosom. S homologno rekombinacijo je relativno lahko vstaviti, izbrisati ali spreminjati (mutirati) katerikoli del kromosoma kvasovke *S. cerevisiae*. Za razliko od nekaterih drugih modelnih organizmov, kjer lahko spreminjanje traja mesece ali leta, pri kvasovki traja le nekaj dni (Sherman, 1991). Tako lahko v kvasovki raziskujemo izraflanje love-kih ali drugih evkariontskih genov (Melese in Hieter, 2002).
7. Veliko -tevilo kvasnih genov ima ortologe pri sesalcih. Kvasovka in lovek si delita nekaj tiso ortolognih genov, kar predstavlja ve kot tretjino kvasnega genoma (O'Brien in sod., 2005; Nielsen, 2009; Aashiq, 2015).

2.1.1 Nadome- anje kvasnih genov z geni sesalcev

Prednosti, ki jih ima kvasovka *S. cerevisiae* kot modelni organizem, so pripeljale do eksperimentov, s katerimi posku-amo z nadome- anjem kvasnih genov s sesalskimi ortologi raziskati njihovo funkcijo.

2.1.1.1 Ortologija in paralogija

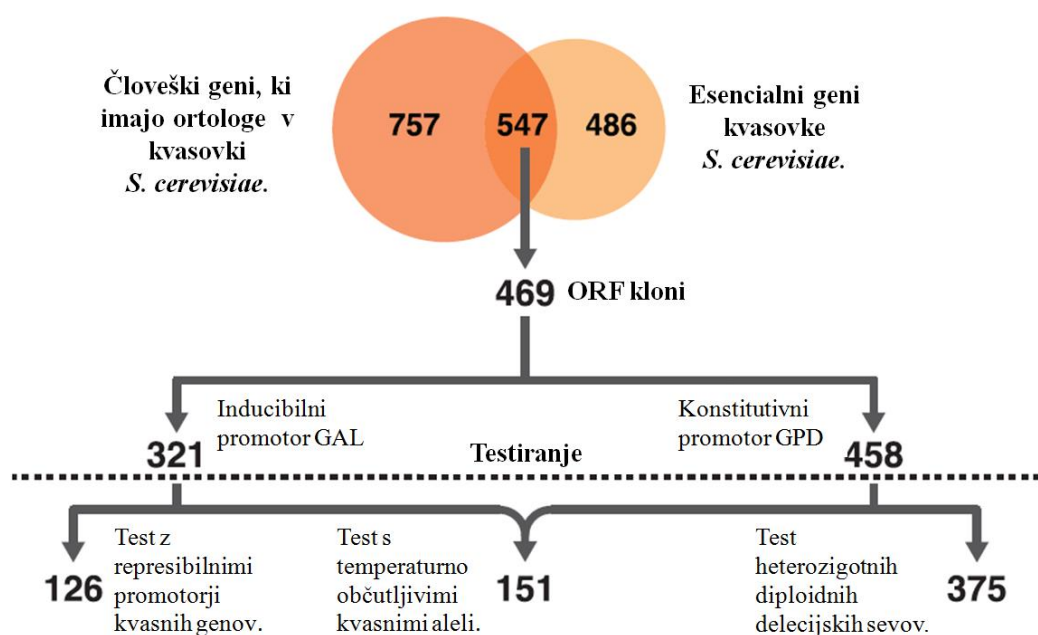
Prvi, ki je vpeljal koncept ortologije in paralogije, je bil Walter Fitch (1970). S tema dvema izrazoma je glede na na in spreminjanja gena od skupnega prednika dalje opisoval dva bistveno razli na tipa homolognih odnosov med geni. Ortologi so geni, ki so se razvili s speciacijo, medtem, ko so paralogi nastali s podvajanjem oziroma duplikacijo genov v istem organizmu. Termina ortolog in paralog sta po vzponu primerjalne genomike v poznih devetdesetih letih prodrli v biolo-ke raziskave (Koonin, 2011). Jasna opredelitev ortologije med geni je nepogre-ljiva za rekonstrukcijo evolucije vrst in njihovih genomov (Baldauf, 2003). T-ve , ker ortologi lahko pripeljejo do skupnega gena predni-kega organizma primerjanih vrst, je ortologija najbolj natan en na in za opisovanje razlik in podobnosti med genomi razli nih vrst (Sonnhammer in sod., 2002; Koonin in sod., 2005). Sklicevanje na ortologijo je najpomembnej-e v primeru, ko prena-amo informacije o funkciji iz eksperimentalno karakteriziranih genov modelnih organizmov na nekarakterizirane gene (Dolinski in sod., 2007). Prenos funkcijske anotacije temelji na povezavi ortologija-funkcija (ang. »orthology-function conjecture«), iz katere predpostavljamo, da imajo ortologni geni razli nih vrst podobno ali identi no funkcijo. Na drugi strani pa se funkcija pri paralogih po duplikaciji ponavadi razlikuje (Koonin in sod., 2005). Povezava je podprta s primerjalnimi analizami vzorca izraflanja genov, genetskimi interakcijami in kemogenomskimi raziskavami (Nehrt in sod., 2011; Chen in Zhang, 2012; Kapitzky in sod., 2010; Ryan in sod. 2012; Frost in sod., 2012). Vendar pa so nedavno nazaj Studer in sod. (2009) podvomili v povezavo ortologija-funkcija. Predstavili so raziskavo, v kateri so bili paralogi v enem organizmu med seboj bolj funkcijsko podobni kot ortologi v razli nih organizmih na enaki ravni divergence.

etudi imata produkta dveh genov iz razli nih organizmov enako funkcijo, ni vedno mogo e nadomestiti enega z drugim, posebno v primeru, ko sta organizma evolucijsko oddaljena. Razsefnost zamenjav, ko gen iz evolucijsko oddaljenega organizma lahko uspe-no nadomesti svojega ortologa, ter kako in zakaj je to mogo e med razli nimi vrstami, je -e precej nepoznano (Aashiq in sod., 2015).

2.1.1.2 Humanizacija kvasnih genov

lovek in kvasovka *S. cerevisiae* sta se lo ila od skupnega prednika pred približno 1 milijardo let (Douzery in sod., 2004). Delita si nekaj tiso ortolognih genov, kar zna-a ve kot tretjino kvasnega genoma (O'Brien in sod., 2005). Podobnost aminokislinskega zaporedja med ortologi je med 9 in 92 %, genomska podobnost pa je v povpre ju 32 % (Aashiq in sod., 2015).

Do nedavnega smo poznali le posamezne primere, ko so love-ki geni uspe-no nadomestili kvasne ortologe. Meseca maja letos pa so Aashiq in sod. predstavili rezultate obsefne raziskave, v kateri so poskusili s love-kimi ortologi nadomestiti 469 esencialnih kvasnih genov. Vsak od teh genov je nujno potreben za rast kvasovke pri normalnih laboratorijskih pogojih (Tong in sod., 2001; Winzeler in sod., 1999) in ima le enega love-kega ortologa.

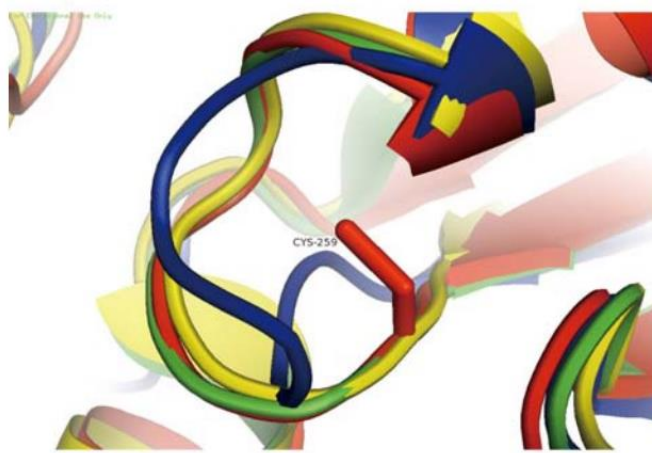


Slika 1: Sistemati no nadome-anje esencialnih kvasnih genov z njihovimi love-kimi homologi. Od 547 love-kih genov, ki imajo homologe v kvasovki *S. cerevisiae* je bilo 469 love-kih odprtih bralnih okvirjev (ORF) kloniranih v vektorje. V kvasovki je bila prisotna le ena kopija vektorja, na njem pa ORF pod inducibilnim promotorjem GAL ali konstitutivnim promotorjem GPD. Z uporabo treh testov (repressibilni promotorji, temperaturno občutljivimi kvasnimi aleli in heterozigotni diploidni delecijiski sevi) so zabeleffili skupno 652 primerov, v katerih je bilo nadome-anje kvasnih genov s humanimi uspe-no. Povzeto po Aashiq in sod., 2015.

Po tem, ko so Aashiq in sod. (2015) potrdili, da delecija kvasnega gena vpliva na rast kvasovk, so testirali, ali izraflanje ortologa na plazmidu lahko povrne rastni fenotip (hitrost rasti) na raven divjega tipa. Odkrili so, da 176 love-kih genov (43 %) lahko funkcijsko nadomesti kvasne ortologe, 238 love-kih genov (57 %) pa tega ne more. Pokazali so, da ima ve ina ohranjenih kvasnih oziroma love-kih proteinov enako vlogo v obeh organizmih in tako lahko love-ka DNA, ki kodira proteine, nadomesti kvasno DNA. Zamenjava posameznega gena je specifi na in odvisna od vrste poti, kar kaffe na to, da bi bila izvedljiva tudi zamenjava skupine genov izvedljiva. Slednji rezultat odpira mofnost za humanizacijo celotnih celi nih procesov v kvasovki. Tako bi lahko spremenjeni sevi kvasovke olaj-ali raziskave na podro ju preizku-anja zdravil proti love-kim proteinom in omogo ili lafje raziskovanje love-kih genskih polimorfizmov ter odgovorov na zdravila. Nenazadnje, potrdili so, da humanizacija kvasnega genoma omogo a raziskovanje funkcije posameznih love-kih genov.

2.2 SESALSKA PROTEINA Tum1 (*Homo sapiens*) IN Tst (*Mus musculus*)

love-ki protein Tum1 (tRNA thiouridin modification protein 1«) in mi-ji protein Tst (ang. thiosulfate sulfurtransferase«) sodita v druffino proteinov, ki vsebujejo domeno RLD (ang. »rhodanese-like domain«) (Bordo in sod., 2002). V druffini so encimi, ki katalizirajo prenos fveplovega atoma do cianida in sluffijo kot vsestranski prena-alcii fveplovega atoma (ang. »thiosulfate sulfurtransferases« (TST) in »3-mercaptopyruvate sulfurtransferases« (MPST)) (Gliubich in sod., 1996; Spallarossa in sod., 2004). Zna iltost druffine je cisteinski ostanek, ki je vedno za etek motiva aktivnega mesta domene proteina RLD, sestavljenega iz -estih aminokislin, in nujno potreben za prepoznavanje substrata (Bordo in sod., 2002). Motiv -estih aminokislin v aktivnem mestu je ohranjen pri vseh proteinih iz skupine MPST (ang. »3-mercaptopyruvate sulfurtransferases«) (Bordo in sod., 2002).



Slika 2: Strukturno prileganje proteina Tum1 kvasovke *S. cerevisiae* in njegovih homologov. Tum1 (rde a), love-ki hMPST (zelena), E.coliMPST iz bakterije *Escherichia coli* (modra) in LeishMPST iz *Leishmania major* (rumena). Povzeto po Qiu in sod., 2012.

V podatkovni zbirki Protein Data Bank najdemo -tiri strukture proteinov iz druffine MPST (Sl. 2, Pril. B) (Qui in sod., 2012). love-ki MPST (hMPST), MPST iz *E. coli* in kvasni MPST (Tum1) imajo dve domeni RLD, medtem, ko ima MPST iz praffivali *Leishmania major* tri domene RLD. Tiri vrste proteinov imajo visoko ohranjeno tudi strukturo proteina ó polkrofnó aktivno mesto je prisotno pri vseh -tirih vrstah proteinov, le pri *E. coli* je prisotno manj-e odstopanje, kar pa kafe na raznolikost evkariontskih in prokariontskih proteinov (Sl. 2) (Qiu in sod., 2012).

2.2.1 Funkcija sesalskih proteinov Tst in Tum1

Do danes fiziolo-ka vloga proteinov iz druffine RLD -e ni popolnoma razjasnjena. Znano je, da so proteini iz druffine RLD povezani z velikim -tevilom biolo-kih procesov, vklju no z detoksifikacijo cianida, homeostazo celi nega fvepla v splo-nem, prisotnostjo pri degradaciji L-cisteina in pri mitohondrijski produkciji vodikovega sulfida (H_2S) kot signalne molekule pri biosintezi encimskih kofaktorjev, vitaminov in nukleinskih kislin, ki vsebujejo fveplo (Shibuya in sod., 2009; Ubuka in sod., 1992; Dahl in sod., 2011; Palenchar in sod., 2000; Yadav in sod., 2013).

Pokazano je bilo, da je mi-ji protein Tst vpleten v lipidni metabolizem (Horvat, neobjavljeno). V magistiskem delu nas je zanimalo, ali protein Tum1, potencialni funkcijski homolog mi-jega proteina Tst, vpliva na lipidni metabolizem kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3 GEN *TUM1* (*YOR251c*) IN PROTEIN Tum1 KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

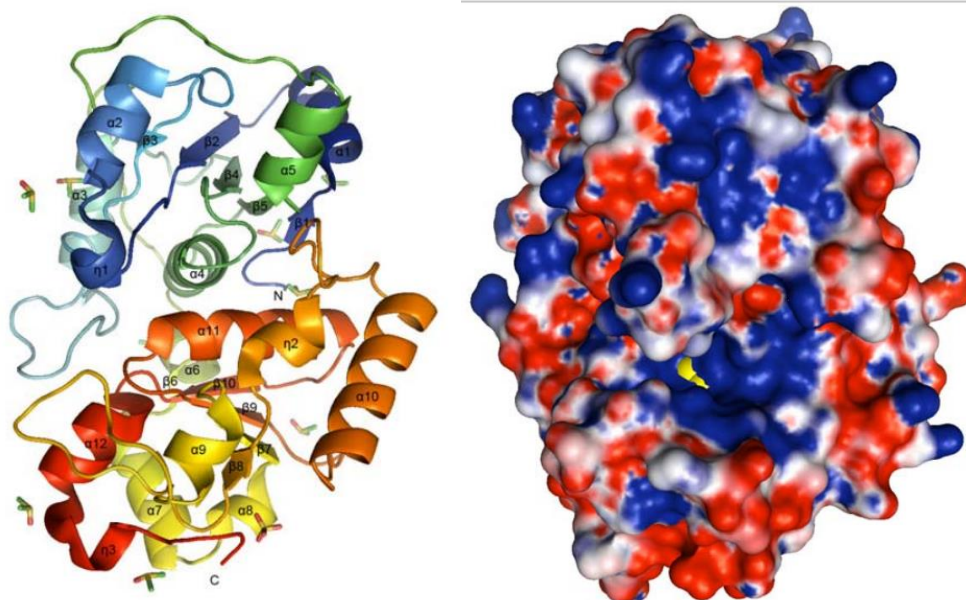
Odpri bralni okvir *YOR251c* (*TUM1*) kvasovke *S. cerevisiae* je bil odkrit med sekvenciranjem 36775 bp dolgega segmenta desne ro ice kromosoma 15 (Poirey in sod., 1997).

2.3.1 Zgradba proteina Tum1

Kvasni protein Tum1 sestavljata dve podenoti RLD z enako obliko, ki sta zna ilni za prena-alce fveplovega atoma (ang. »thiosulfate sulfurtransferases« in »3-mercaptopyruvate sulfurtransferases«) (Gliubich in sod., 1996; Spallarossa in sod., 2004). Vsaka podenota RLD vsebuje centralno β -plo- o, ki je sestavljena iz petih β -verig (AEDBC). Na N-terminalni domeni je β -plo- a obkroflena s petimi -heliksi (1-5). Na C-terminalni domeni pa je sedem -heliksov (6-12) (Qiu in sod., 2012).

Motiv oziroma zanka aktivnega mesta proteina Tum1 je sestavljena iz zaporedja CGTGVS, ki povezuje plo- o 2 ter heliks 11, kar je podobno ohranjenemu motivu

CG[S/T]GVT proteinov MPST. Prav zaradi slednje lastnosti protein Tum1 uvr-amo v drufino MPST (Qiu in sod., 2012).



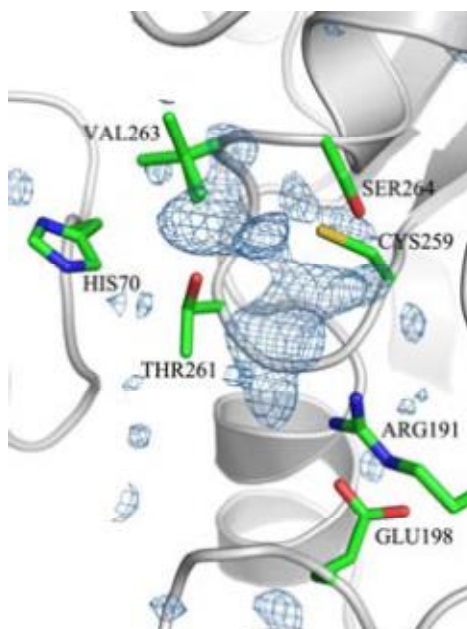
Slika 3 in slika 4: Tridimenzionalna zgradba kvasnega proteina Tum1. Levo: prikazane so sekundarne strukture proteina in molekuli DMSO ter SO_4^{2+} . Desno: model povr-ine proteina Tum1. Ohranjeni cistein (Cys259) je ozna en z rumeno barvo (Qiu in sod., 2012).

To kovna mutageneza je pokazala, da je v proteinu Tum1 le Cys259 na C-terminalnem koncu domene RLD nujno potreben za nastanek persulfida. Na N-terminalni domeni RLD pa protein Tum1 nima ohranjenega cisteina, domena je neaktivna (Noma in sod., 2009). Model za povr-inski elektrostatski potencial Tum1, ki so ga izdelali Qiu in sod. (2012) je razkril pozicijo ohranjenega cisteina (Cys259), ki se nahaja se na dnu globoke in ozke refle aktivnega mesta med dvema domenama RLD, kjer je veliko pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov in je tako tefiko dostopen za velike molekule (Sl. 4).

Blizu zanke aktivnega mesta je o itno, ampak -e nepojasnjeno obmo je elektronske gostote, ki je nekoliko ve je od aminokislina (Sl. 5). Tiri aminokislina (Cys259, Thr261, Val263, Ser264) okoli elektronske gostote tvorijo plitvo udrtino aktivnega mesta. Arg191, ki je edina pozitivno nabita aminokislina se nahaja na nasprotni strani, His70 in Glu198 pa -e dlje stran. Aminokislini Arg191 in His70 proteina Tum1 Spallarossa in sod. (2004) primerjajo z aminokislinama Arg102 in His66 proteina MPST iz *E. coli*, ki sta pomembna za sidranje in stabilizacijo substrata.

Nazadnje so elektronsko gostoto v bliflini aktivnega mesta pojasnjevali Qiu in sod. (2012), ki so postavili hipotezo, da elektronska gostota predstavlja kofaktorje ali substrate, ki so prisotni pri prenosu fvepla med Uba4 in Nfs1 s pomo jo Tum1. Izhajali so iz rezultatov raziskovalcev Bordo in sod. (2002), ki so pokazali, da so substrati prena-alcev fveplovega

atoma razli ni v *in vivo* ter *in vitro* reakcijah. Prav razkritje neznanega liganda oziroma substrata bo v prihodnosti morda omogo ilo bolj-e razumevanje mehanizma prenosa fveplovega atoma (Qiu in sod., 2012).



Slika 5: Nepojasnjena elektronska gostota v blifini aktivnega mesta proteina Tum1. Aminokisliline aktivnega centra so izrisane barvno. Povzeto po Qiu in sod. (2012).

2.3.2 Funkcija proteina Tum1

Do danes edina opisana biolo-ka vloga proteina Tum je da skupaj s -e -tirimi proteini sodeluje pri modifikaciji (tiolaciji) ohlapnega uridina na treh molekulah prena-alnih RNA (tRNA) (tQ^{UUG} , TK^{UUU} in tE^{UUC}), ki imajo na mestu ohlapnega nukleotida 2-tiouridin (Huang in sod., 2008; Leidel in sod., 2009; Noma in sod., 2009).

2.3.2.1 Prena-alna RNA (tRNA)

Na vseh stopnjah flivljenja je nujno potreben natan en prenos biolo-ke informacije. V celicah se lastnost kafe kot prevajanje genetskega koda iz DNA v proteine. Posredniki zadnje stopnje tega procesa so mRNA, tRNA, ribosomi ter mnogi drugi faktorji. Informacijo, ki je pomembna za nastanek proteinov, nosi mRNA (Crick, 1966; Agris, 1991). Univerzalni genski kod je sestavljen iz 64 tripletov nukleotidov (kodonov), od katerih je 61 zapisov za razli ne aminokisliline, 3 tripleti pa so signal za zaustavitev prevajanja (Nirenberg, 2004). Degeneracija genskega koda pomeni, da za ve ino aminokislin obstaja ve kot en kodon. Tvevilo razli nih tRNA molekul je vedno manj-e od 61, kar kafe na to, da nekatere molekule tRNA prepoznajo ve kot en kodon. To je mogo e zaradi dejstva, da se prvi nukleotid antikodona oziroma 34. nukleotid molekule tRNA,

poimenovan tudi ohlapni nukleotid, lahko povefle z ve kot enim nukleotidom na tretji poziciji kodona (Crick, 1966).

Antikodon molekule aminoacil tRNA (aa-tRNA) se bazno pari s kodonom na mRNA. Ta interakcija omogo i ribosomu, da zaporedno doda aminokislino na fle obstoje protein. Kognatna tRNA je tista tRNA, katere antikodon se s prvima dvema nukleotidoma kodona povefle s standardnimi Watson-Crickovimi vezmi, ohlapni nukleotid oziroma zadnji nukleotid pa se povefle ali na enak na in kot prva dva nukleotida, torej z Watson-Crickovimi vezmi, ali pa z vezmi, druga nima od Watson-Crickovih (Crick, 1966; Agris, 1991). Molekule tRNA, ki ne ustrezajo opisanim kriterijem, imenujemo nekognatne tRNA. Uporaba nekognatnih tRNA povzro i napake v prevajanje oziroma druga nosmiselne mutacije. Te so uvedene v nizkih frekvencah (10^{-3} do 10^{-4} na kodon) (Kramer in Farabaugh, 2007).

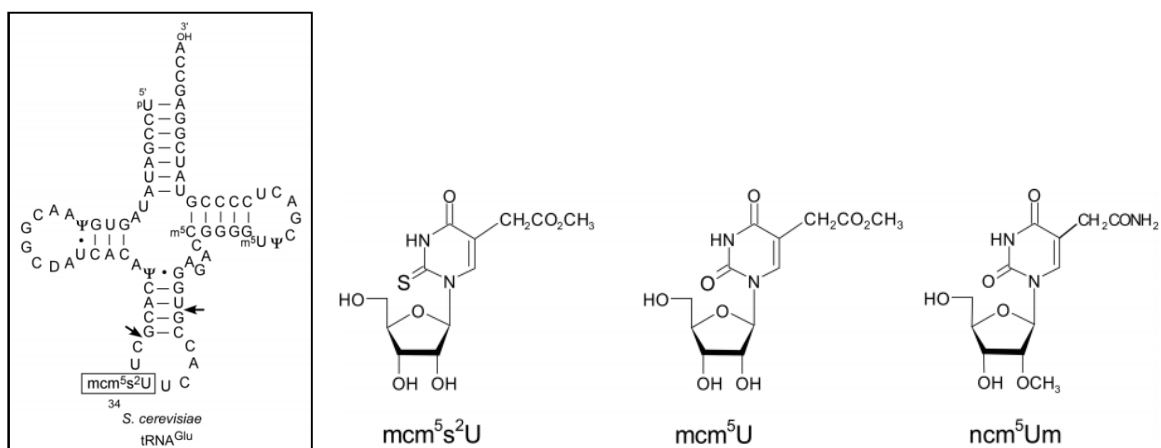
2.3.2.2 Tiolacija ohlapnega uridina prena-alne RNA

Posttranskripcijske modifikacije dajo molekulam RNA pomembne strukturne lastnosti in tako igrajo pomembno vlogo pri biogenezi, metabolizmu, strukturni stabilnosti in funkciji RNA. Do danes je bilo opisanih ve kot 100 vrst modifikacij RNA, od katerih je ve ina modifikacij tRNA (Rozenski in sod., 1999;).

Ko je Francis Crick objavil hipotezo o ohlapnem nukleotidu, -e ni bilo znano, da citoplazemske molekule tRNA skoraj nikoli ne vsebujejo nespremenjenega uridina kot ohlapnega uridina. Tle dopolnjena Crickova hipoteza o ohlapnem nukleotidu je razlofila nekatera, do takrat nepojasnjena odkritja, ki se nana-ajo na molekule tRNA s spremenjenimi ohlapnimi uridini (Yokoyama in sod., 1985; Agris, 1991; Lim, 1994; Takai in Yokoyama, 2003).

Molekule tRNA z modificiranimi ohlapnimi uridini prepoznajo razli ne kodone in tako kodirajo ve kot eno aminokislino. Na uridin oziroma njegov peti ogljik je lahko pripeta funkcionalna skupina, ali pa je nukleotid spremenjen na tri druge na ine (Sl. 6) (Bjork in Hagervall, 2005; Bjork in sod., 2007).

Ohlapni uridini molekul tRNA za aminokislino Gln, Lys in Glu so univerzalno spremenjeni v 5-metil-2-tiouridinske derivate (xm^5s^2U). Bakterijske molekule tRNA imajo 5-metilaminometil-2-tiouridin in 5-karboksimetil-2-tiouridin, mitohondrijske sesalske tRNA imajo 5-taurinometil-2-tiouridin, citoplazemske tRNA evkariontov pa 5-metoksikarbonilmetil-2-tiouridin (Suzuki, 2005). fiveplov atom se zaradi velikega van der Waalsovega radija odbija od hidrosilne skupine na mestu 2'. Tako je derivat na uridinu (xm^5s^2U) name- en na C3 koncu ob ribozi (Yokoyama in sod., 1985). Zaradi te lastnosti ohlapnega uridina se ta preferen no pari s purini in tako prepre uje zamenjavo s kognatnimi kodoni, ki se kon ujejo s pirimidini (Agris in sod., 1973).



Slika 6: Spremenjeni ohlapni uridini, prisotni v tRNA kvasovk. Od leve proti desni: molekula tRNA, 5-metilkarboksimetil-2-tiouridin (mcm⁵s²U), 5-metilkarboksimetil-uridin (mcm⁵U) in 5-karbamoilmetil-2'-O-metiluridin (ncm⁵Um). Povzeto po: Noma in sod., 2009.

fiveplov atom na ohlapnem uridinu (mcm⁵s²U) je pomemben za u inkovito prepoznavanje kodonov, kar se dogaja na ribosomu (Ashraf in sod., 1999). Tudi ve, Sylvers in sod. (1993) so pokazali, da sluffi fiveplov atom na molekuli tRNA za glutamat (tE^{UUC}) kot prepoznavni element, ki ga prepozna glutamatna-tRNA-sintetaza. Odsotnost spremenjenega ohlapnega uridina (xm⁵s²U) na mutirani mitohondrijski molekuli tRNA za lizin (mt-tK^{UUU}) pri bolezni miokloni ni epilepsiji z natrganimi rde imi vlakni (MERRF sindrom) se kaže kot nezmožnost prevajanja v mitohondrijih (Yasukawa in sod., 2000; Yasukawa in sod., 2001). Slednja dva primera kaže na pomembno vlogo tiolacije ohlapnega uridina tRNA pri sintezi proteinov.

2.3.2.3 Mehanizem tiolacije ohlapnega uridina prenašalne RNA

Prvi, ki so odkrili, da protein Tum1 sodeluje pri tiolaciji ohlapnega uridina tRNA kvasovke *S. cerevisiae*, so bili Huang in sod. (2008). Med iskanjem sevov, ki so odporni na toksin zimocin, ki ga izloča *Kluyveromyces lactis*, so ugotovili, da veina teh sevov nima tioliranega ohlapnega uridina na molekuli tRNA. Zimocin oziroma njegova podenota je endonukleaza, ki cepi tRNA, ki vsebuje tioliran ohlapni uridin (Lu in sod., 2005). Odsotnost skupine mcm⁵s²U pri treh vrstah tRNA (Q^{UUG}, TK^{UUU} in tE^{UUC}) onemogoča vezavo toksina na tRNA. Mutante v sintezi 2-tio skupine na ohlapnem uridinu, med katere sodi tudi *tum1Δ*, so tako odporne na zimocin. Tiolacija ohlapnega uridina molekule tRNA pri sevu *tum1Δ* ne manjka popolnoma, saj 29 % tRNA molekul ostane tioliranih, hkrati pa se za 92 % pove prisotnost predhodnika skupine mcm⁵s²U, to je mcm⁵U (Lu in sod., 2008; Huang in sod., 2008).

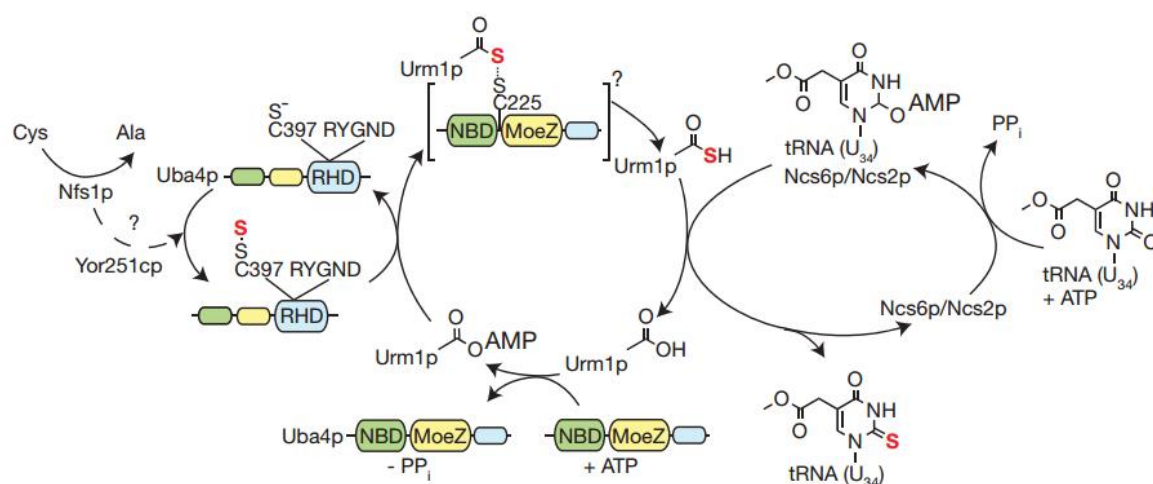
Rezultate nadaljnjega raziskovanja vloge proteina Tum1 pri tiolaciji ohlapnega uridina tRNA sta leta 2009 v razmaku dveh mesecev objavili dve raziskovalni skupini. Noma in

sod. (2009) so izvedli s t. i. ribonukleomsko analizo. Pri tej analizi za iskanje genov, katerih produkti sodelujejo pri spreminjanju molekul RNA, izolirajo RNA iz delecijjskih mutant in identificirajo manjkajo e modificirane nukleotide z masno spektrometrijo. Izmed 4829 delecijjskih sevov kvasovke *S. cerevisiae* so z uporabo podatkovne zbirke CYGD (ang. »the Comprehensive Yeast Genome Database«) izbrali 767 sevov: raziskali so gene, ki imajo neznano funkcijo, homologa v kvasovki *S. pombe* ter niso podobni fle karakteriziranim proteinom v kvasovki. Zanimali so jih sevi, pri katerih ohlapni uridin molekule tRNA ni tioliran oziroma manjka skupina mcm^5s^2U , medtem, ko je raven prekursorja mcm^5U vi-ja, kar kaffe na specifi no vlogo gena pri tiolaciji tRNA. Delecijjski sevi, ki so ustrezali kriterijem so *uba4Δ*, *nsc2Δ*, *nsc6Δ* in *tum1Δ*. Pri slednjem delecijjskem sevu je manj-i delef molekul tE^{UUC} ostal 2-tioliran (mcm^5s^2U). Biokemijska analiza je pokazala, da poteka tvorba evkariontskega 2-tiouridina preko kemijske reakcije, ki je povezana z ubikvitinacijo. Prenos fveplovega atoma se pri evkariontih razlikuje od sistema, ki je bil opisan pri bakterijah in temelji na persulfidni kemiji. Zaklju ili so, da prisotnost produkta gena *TUM1* v tej biokemijski poti ni nujno potrebna, je pa pomembna za uspe-en nastanek 2-tiouridina. Torej lahko 2-tiolacija ohlapnega uridina delno pote e preko poti, v kateri ni prisoten protein Tum1.

Dva meseca kasneje so Leidel in sod. (2009) objavil rezultate raziskave signalne poti tiolacije ohlapnega uridina, posredovane s proteinom Urm1. S poliakrilamidno gelsko elektroforezo z APM, masno spektrometrijo in prenosom northern so potrdili, da v delecijjskih sevih *uba4Δ* in *urm1Δ* manjka frakcija tioliranega uracila ter dokazali, da je biokemijska pot URM1 pomembna za tiolacijo ohlapnega uridina. Izvedli so metodo za sistemati no dolo anje sinteti nih genetskih interakcij v kvasovki *S. cerevisiae* (ang. »synthetic genetic array (SGA) analysis«). Preko kriflanja zbirke SKO s preverjanima sevoma *uba4Δ* in *urm1Δ* ter pregleda sposobnosti rasti dvojnih mutant so identificirali interaktorje obeh genov. Genoma je bilo skupnih 24 sinteti nih interakcij. Z uporabo genske ontologije (Gene Ontology) so gene v interakciji uvrstili v skupino »nukleinske kisline in metabolizem«. V to skupino med drugimi spadajo tudi vse ne-esencialne komponente elongatorskega kompleksa. Za preverjana seva pri metodi SGA so zato kasneje uporabili tudi delecijjska seva *elp4Δ* in *elp6Δ*. V kombinaciji z recipro nim tandemskim afinitetnim i-enjem potencialno interagirajo ih proteinov in masno spektrometrijo ter kvasnim dvohibridnim sistemom so potrdili interakcije proteinov Ncs2, Ncs6 in Tum1 s proteinom Urm1. Neobjavljeni rezultati iz laboratorija Charlesa Boonea z Univerze v Torontu, v kateri je bil z metodo SGA preverjan delecijjski sev *tum1Δ*, kaffejo na funkcionano povezavo gena *TUM1* z geni *UMR1*, *NCS2*, *NCS6*, *UBA4* in geni kompleksa ELP. Model mehanizma z Urm1 posredovane tiolacije ohlapnega uridina je prikazan na Sliki 7.

eprav je modifikacija ó tiolacija ohlapnega uridina poznana fle dolgo asa, je njena biolo-ka vloga -e vedno relativno nejasna. Laxman in sod. (2013) so pokazali, da raven

tioliranega ohlapnega uridina v kvasovki *S. cerevisiae* odrafla dostopnost aminokislin, ki vsebujejo fveplo. Tako tiolacija uravnava raven translacije in homeostazo aminokislin in predstavlja klju ni mehanizem s katerim sta translacija in rast sinhrono regulirani z metabolizmom. Tiolacija tRNA je aktivno zmanj-ana v primeru, ko v okolju ni dovolj aminokislin z fveplom. Slednja odkritja so pomembna za razumevanje mehanizmov za celi no zaznavanja aminokislin in kafejo kako aminokislina, ki vsebujejo fveplo, sluffijo kot pomembni metaboliti za nadzor rasti celic (Laxman in sod., 2013; Sutter in sod., 2013).



Slika 7: Model mehanizma z Urm1 posredovane tiolacije ohlapnega uridina. Protein Tum1 je ozna en z oznako odprtega bralnega okvirja Yor251cp. Prenos fvepla poteka z urmilacijo, mehanizmom, pri katerem Uba4 deluje kot encim E1, ki prenese fveplov atom do proteina Urm1. Po adenilaciji s podenoto NBD proteina Uba4 se Urm1 s pomo jo podenote RHD proteina Uba4 pretvori v Urm1-tiokarboksilat. fveplo je nato preneseno na ohlapni uridin molekule tRNA. Prenos fvepla poteka na dva na ina ó direktno ali s pomo jo proteinskega kompleksa Ncs6-Ncs2. Protein Tum1 (Yor251cp) aktivira protein Nfs1 in sprejme fveplov atom, ki ga potem predvidoma prenese na podenoto RLD proteina Uba4. Protein Uba4 lahko sprejme fveplov atom tudi neposredno od proteina Nfs1, kar pomeni mimo s proteinom Tum1 posredovanega prenosa fvepla (Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009). Povzeto po: Leidel in sod., 2009.

2.3.2.4 Druge funkcije proteina Tum1

Rast delecijskega seva *tum1Δ* na goji- u YPD z dodanim rapamicinom (2 nM) je manj-a v primerjavi z rastjo divjega tipa. Rast delecijskega seva *tum1Δ* na goji- u YPD z dodanim rapamicinom (2 nM) je manj-a tudi v primerjavi z rastjo delecijskega seva na goji- u YPD brez dodanega rapamicina. Rapamicin inhibira delovanje kinaz Tor1 in Tor2. Goehring in sod. (2003) so predpostavili, da sev, ki ob prisotnosti rapamicina raste po asneje, sodeluje pri oja anju TOR signaliziranja, ali pa sodeluje pri celi nih procesih, ki jih TOR signalna pot uravnava. Prekomerno izraflanje specifi nih molekul tRNA (tQ^{UUG} , TK^{UUU} in tE^{UUC}) v delecijskem sevu *tum1Δ* ne vrne hitrosti rasti na goji- u YPD z dodanim rapamicinom (2 nM) na raven divjega tipa. Po drugi strani pa prekomerno izraflanje treh specifi nih vrst molekul tRNA supresira slab-o rast delecijskih sevov *ncs2Δ* in *ncs6Δ* na goji- u YPD z

dodanim rapamicinom (2 nM). Rezultati kafejo na nove, do danes –e neopisane vloge proteina Tum1 v kvasovki *S. cerevisiae* (Leidel in sod., 2009). Hipotezo podpira tudi dejstvo, da v delecijjskih sevih *uba4Δ*, *urm1Δ*, *ncs6Δ* in *ncs2Δ* ne opazimo tiolirane tRNA, v sevu *tum1Δ* pa manj-i delef tRNA kljub deleciji ostane tioliran (Leidel in sod., 2009; Noma in sod., 2009).

2.3.3 Lokalizacija proteina Tum1

Noma in sod. (2009) so za lokalizacijo proteina Tum1 v celici uporabili predhodno izvedene proteomske analize. Te protein Tum1 ume- ajo v citoplazmo in mitohondrij (Kumar in sod., 2002; Huh in sod., 2003; Sickann in sod., 2003). Vendar pa po pregledu izvornih virov nismo na-li jasnega dokaza o lokalizaciji Tum1.

Citoplazemsko lokalizacijo proteina Tum1 posredno podpirajo naslednja odkritja. Leidel in sod. (2009) so dokazali, da je biokemijska pot URM1, v kateri sodelujejo Urm1, Uba4, Tum1, Ncs2 in Ncs6, pomembna le za tiolacijo citoplazemske tRNA in ne tudi mitohondrijske tRNA. V delecijjskih sevih *urm1Δ* ter *uba4Δ* tiolacija ohlapnega uridina treh vrst mitohondrijske tRNA (mt-tK^{UUU}, mt-tE^{UUC} in mt-tQ^{UUG}) ni spremenjena (Leidel in sod., 2009). Na drugi strani pa iste tri vrste tRNA v delecijjskem sevu *slm3Δ* niso tiolirane. Protein Slm3 je pomemben za 2-tiolacijo ohlapnega uridina mt-tRNA (Umeda in sod., 2005). Noma in sod. (2009) so raziskali le tioliranost molekule mt-tK^{UUU}. Te vrste mt-tRNA, izolirane iz delecijjskih sevov *urm1Δ*, *uba4Δ*, *tum1Δ*, *ncs2Δ* in *ncs6Δ*, so normalno tiolirane, kar kafe na to, da so geni *URM1*, *UBA4*, *TUM1*, *NCS2* in *NCS6* specifi ni za 2-tiolacijo tRNA v citosolu (Noma in sod., 2009). Zanimivo je, da v kvasovki *S. cerevisiae* citosolna tK^{UUU} prehaja iz citosola v mitohondrij, medtem ko tK^{UUU} ostaja v citosolu. V mitohondriju pa najdemo zapis za molekule mtK^{UUU} (Martin in sod., 1979).

2.4 LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

Lipidi so definirani kot organske substance, topne v nepolarnih organskih topilih, ne pa v vodi. So dokaj majhne biomolekule, ki po zna ilnostih variirajo od mo no hidrofobnih do amfifilnih. Lipidi so nujno potrebni gradniki vsake flive celice. Kvasovka *S. cerevisiae* je zaradi dobro ohranjenih mehanizmov, podobnih drugim evkariontom, zaradi dostopnosti delecijjskih mutant, ki odraflajo spremembe v metabolnih poteh lipidov in zaradi relativno enostavnega rokovanja postala zanesljiv modelni organizem za raziskave na podro ju biokemije, molekularne biologije in celi ne biologije lipidov ó raziskave sinteze, shranjevanja in razgradnje lipidov (Winzeler in sod., 1999; Klug in sod., 2014; Daum in sod., 2014). Lipidi predstavljajo okoli 6 % suhe mase kvasnih celic, gojenih v bogatem goji- u YPD. Polovico predstavljajo fosfolipidi, drugo polovico pa steroli in zalofne ma- obe (Henry, 1982; Daum in sod., 1998). Glede na kemijske in biokemijske lastnosti

lipide razdelimo v osem skupin ó to so ma-obne kisline (MK), glicerolipidi, glicerofosfolipidi, steroli in sterolni derivati, sfingolipidi (SL), prenloli lipidi, glikolipidi in poliketidi (Fahy in sod., 2011). Lipidi gradijo biolo-ke membrane, ali pa so shranjeni v razli nih organelih in sluffijo kot energijske zaloge, strukturni elementi, signalne molekule in kot mediatorji membranske fuzije in apoptoze (Daum in sod., 1998; Souza in Pichler, 2007; Escriba in sod., 2014; Rego in sod., 2014).

V metabolizmu lipidov je udelefenih ve celi nih kompartmentov (Natter in sod., 2005). Glavna organela, v/na katerih poteka sinteza lipidov, sta endoplazemski retikel in Golgijev aparat. Vendar pa lipide sintentizirajo tudi mitohondriji in najdemo jih tudi v peroksisomih ter seveda lipidnih kapljah, kjer se skladi- ijo. Iz lipidnih kapelj so lipidi mobilizirani za produkcijo energije ali sintezo kompleksnih lipidov (Czabany in sod., 2007; Rajakumari in sod. 2008). eprav ve ina lipidov (fosfatidilholin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, steroli, SL) pride v mitohondrij od drugod, v njem -e vedno poteka sinteza MK in nekaterih fosfolipidov (fosfatidna kislina, kardiolipin, fosfatidiletanolamin) (Tehlivets in sod., 2007; Kuchler in sod., 1986; Henry in sod., 2012). Peroksisomi kvasovke *S. cerevisiae* vsebujejo 50 % fosfatidilholina, 23 % fosfatidiletanolamina, 16 % fosfatidilinozitola in 7 % kardiolipina (Zinser in sod., 1991). Kvasni peroksisomi, poleg tega, da so udelefeni v detoksifikacijskih procesih, sodelujejo tudi pri razgradnji MK. Z β -oksidacijo, ki pri kvasovkah poteka izklju no v peroksisomih, MK postanejo dostopne kot energijski vir (Poirier in sod., 2006).

V magistrski nalogi nas zanimajo predvsem koncentracije sterolnih estrov (SE), triacilglicerolov (TAG) in ergosterola (ERG) v kvasovki *S. cerevisiae*. V nadaljevanju bodo zato natan neje opisani. Druge vrste lipidov bodo predstavljene v obsegu, ki je pomemben za poznavanje celotnega lipidnega metabolizma.

2.4.1 Ma-obne kisline

Ma-obne kisline (MK), katerih verige so pri kvasovki dolge ve inoma 16 ali 18 ogljikovih atomov (C16 in C18), so osnovni hidrofobni gradniki kompleksnih lipidov (Daum in sod., 1998). Sestavljajo FL in SL ali sluffijo kot energijska zaloga ó TAG in SE v lipidnih kapljah, lahko pa so tudi proste. Delujejo kot transkripcijski regulatorji in signalne molekule ter lahko sodelujejo pri post-translacijskih modifikacijah proteinov (Tehlivets in sod., 2007; Nadolski in Linder, 2007). Kvasovka *S. cerevisiae* pridobi MK na tri na ine ó (1) z *de novo* sintezo v citosolu in mitohondrijih, (2) s hidrolizo kompleksnih lipidov ali (3) s privzemom iz zunanjih virov (Tehlivets in sod., 2007). Substrata za ma-obno-kislinsko sintezo sta acetyl koencim A (acetyl-CoA) in njegov 2-karboksiliran produkt malonil koencim A (malonil-CoA) (Fraenkel, 2011). Blokirano *de novo* sintezo MK re-i privzem MK v celico preko specifi nih transporterjev ali z difuzijo iz okolja (Black in Di Russo, 2007). V splo-nem je povi-ana vsebnost prostih MK -kodljiva za kvasne celice. Zato se

internalizirane in aktivirane MK hitro metabolizirajo ó porabijo za sintezo kompleksnih lipidov, se shranijo v lipidnih kapljah, ali pa so preko transporterjev translocirane v peroksisome, kjer se katabolizirajo z βóóksidacijo (Veenhuis in sod., 1987; Van Roermund in sod., 2012).

2.4.2 Membranski lipidi

Membranske lipide delimo na tri skupine ó fosfolipide, sterole in sfingolipide.

2.4.2.1 Fosfolipidi

Fosfolipidi (FL) so zgrajeni iz diaciglicerola kot hidrofobnega repa in razli ne hidrofilne polarne glave, glede na katero so tudi klasificirani. Glavna molekula pri *de novo* sintezi FL in hkrati pomembna signalna molekula ter regulator lipidnega metabolizma je fosfatidna kislina (Athenstaedt in Daum, 1997). Vloge FL so razli ne. Kot strukturni elementi gradijo membrane, udelefleni pa so tudi pri mnogih biolo-kih procesih. So prekurzorji za sintezo membrane, delujejo kot rezervoarji sekundarnih sporo evalcev, vodijo lipidacijo proteinov za nastanek membran in delujejo kot molekulski –aperoni (Carman in Han, 2011; van Meer in sod., 2008).

V kvasovki *S. cerevisiae* izmed FL prevladujejo fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol in fosfatidilserin. Razporeditev slednjih vrst FL se med organeli razlikuje (Zinser in sod, 1991; Horvath in sod., 2011). Nanjo vpliva tudi vir ogljika, ki je kvasovkam na razpolago (Tuller in sod., 1999).

2.4.2.2 Sfingolipidi

Sfingolipidi (SL) so zgrajeni iz sfingozina, na katerega je preko amidne vezi vezana nasi ena MK in se tako tvori ceramid in inozitol fosfat (Schneiter, 1999). Pri kvasovkah jih najdemo predvsem v plazemski membrani, kjer so v interakciji s steroli. Steroli in SL skupaj tvorijo lipidne rafte, membranske domene, ki so odporne na detergente in predstavljajo sidri- e za nekatere proteine (Bagnat in sod., 2000; Guan in sod., 2009; Simons in Sampaio, 2011; Dickson in sod., 2006). Sinteza SL *de novo*, ki se za ne s kondenzacijo serina in palmitoil-CoA, poteka v endoplazemskem retiklu (Nagiec in sod., 1994). eprav imajo SL veliko pomembnih fiziolo-kih vlog, vemo le malo o uravnavanju njihove koncentracije v celici (Dickson in sod., 2006).

2.4.2.3 Metabolizem sterolov

Tako kot MK, tudi steroli nastanejo iz acetil-CoA. Njihova sinteza poteka ve inoma v endoplazemskem retiklu preko nastanka necikli nega pentaizoprenoidnega dela skvalena in njegove pretvorbe preko veliko razli nih sterolov do ergosterola (Parks in Casey, 1995;

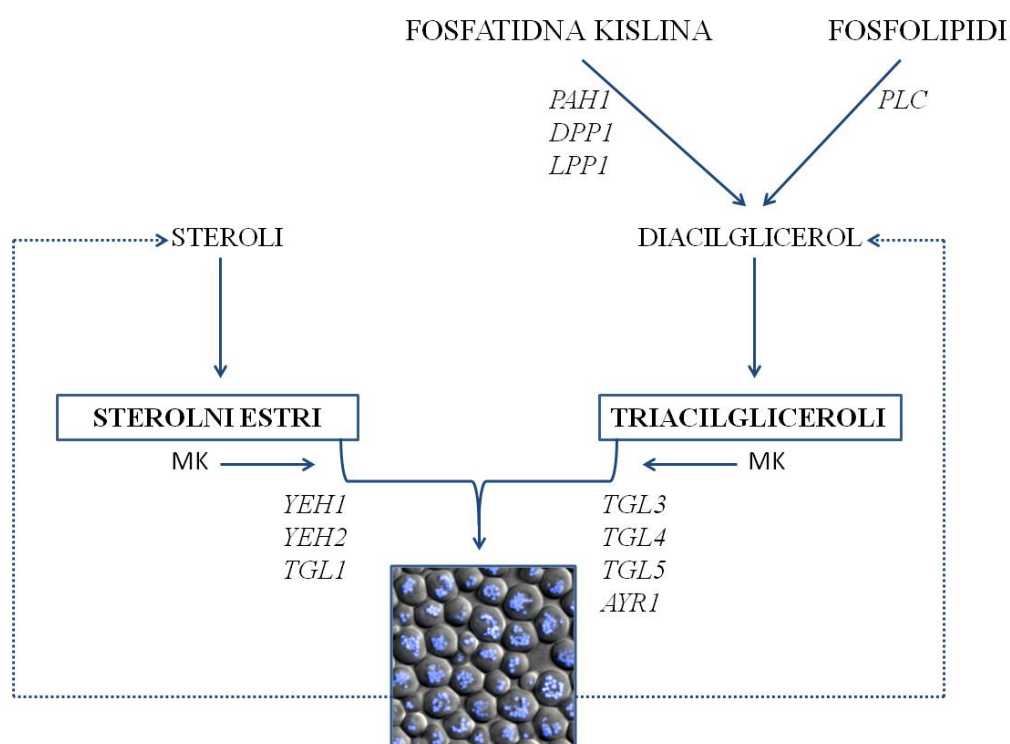
Lees in sod., 1999). Ergosterol je glavni sterol v kvasovki. Njegova biosinteza je ena najbolj kompleksnih biokemijskih poti, ki vklju uje preko trideset biokemijskih reakcij (Kristan in Riffner, 2012).

Steroli so pomembni gradniki evkariontskih celic. Tve , Daum in sod. (1998) so pokazali, da kvasna celica brez njih ni viabilna. Njihova vloga je tako strukturna kot tudi signalna. Zaradi svoje rigidne strukture vplivajo na fluidnost in permeabilnost membrane (Nes in sod., 1993). Koncentracija sterolov je najniflja na mestu njihove biosinteze in v endoplazemskem retiklu, najvi-ja pa na membrani (Zinser in sod., 1993). Razporejanje sterolov med membranami je mo no reguliran proces, ki omogo a vzdrfevanje lastnosti membran kot sta fluidnost in debelina. Poteka vezikularno ali nevezikularno s pomo jo -aperonov in je odvisen od ATP (Jacquier in Schneiter, 2012). Ker kvasovke pod aerobnimi pogoji ve inoma sintetizirajo preve sterolov in jih niso sposobne razgraditi, so za prepre itev -kodljivih u inkov sterolov na membrane potrebni mehanizmi za detoksifikacijo. Kvasovka vzdrfluje sterolno homeostazo na tri na ine ó (1) proste MK zaestri s fosfatidno kislino ali jih shrani v lipidne kaplje, (2) zmanj-a biosintezo sterolov, (3) acetilira sterole in s tem omogo i njihovo izlo anje v okolico (Yang in sod., 1996; Yu in sod., 1996; Zweytick in sod., 2000; Tiwari in sod., 2007). Acetilacija sterolov je bila opisana tudi kot mehanizem za kontrolo kvalitete lipidov, in sicer, steroli, ki zaobidejo kontolo kakovosti, so acetilirani in izlo eni (Choudhary in Schneiter, 2009, 2012).

2.4.3 Napolarni lipidi

Nepolarni lipidi, kot so SE in TAG, so shranjeni v okoli 400 nm velikih okroglih organelih, poimenovanih lipidne kaplje. Lipidne kaplje so zgrajene iz hidrofobne sredice, ki jo ve inoma sestavljajo TAG in okoli-ki SE, katere pokriva monosloj FL z nekaj vsidranimi proteini oziroma encimi, ki so pomembni za lipidni metabolizem (Athenstaedt in sod., 1999; Czabany in sod., 2008; Grillitsch in sod., 2012). S skladi- enjem lipidov se kvasovke izognejo morebitnim toksi nim učinkom, ki jih povzro ajo proste MK in steroli. Steroli se tako zaestrijo v SE, proste MK pa se poveflejo tudi z glicerolom in tvorijo triacilglicerole (TAG) (Zweytick in sod., 2000). Nastanek lipidnih kapelj opisujeta dva modela (ang. »lensing model«, »bicelle formation model«). Prvi model predpostavlja nastanek ovojnice lipidnih kapelj z brstenjem iz endoplazemskega retikla takrat, ko se med membranama akomulirajo TAG in preseflejo kriti no velikost (Guo in sod., 2009). Drugi model predpostavlja, da nastane ovojnica lipidne kaplje iz obeh membran endoplazemskega retikla (Ploegh, 2007). Predpostavljena je bila tudi tretja mofnost za nastanek lipidnih kapelj (ang. »secretory vesicle model«), in sicer nastanek iz sekretornih veziklov, napolnjenih s TAG, vendar rezultati zadnjih raziskav bolj podpirajo prva dva modela (Guo in sod., 2009; Kohlwein in sod., 2013).

Kvasovke seva *dga1Δtro1Δare1Δare2Δ* (opis delovanja genov v poglavju 2.4.4.1 in 2.4.4.2) niso zmožne sinteze nepolarnih lipidov in tako tvorbe lipidnih kapelj, vendar je ta sev viabilen in kafe le manj-i odklon v rasti pri standardnih pogojih glede na izogeni sev (Sandager in sod., 2002). Rast istega mutiranega seva na oleatnem goji- u pa vodi do lipotoksi nosti in vodi do zmanj-anja hitrosti rasti in sprememb v sestavi lipidov membrane glede na izhodni sev. Morfolo-ke spremembe zaradi lipotoksi nega stresa so opazili z elektronskim in fluorescentnim mikroskopom. Presefek nenasi enih MK je preusmerjen v sintezo FL, kar se kafe v pove ani proliferaciji in ve anju membran endoplazemskega retikla (Petschnigg in sod., 2009; Connerth in sod., 2010).



Slika 8: Metabolizem nepolarnih lipidov v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Povzeto po Ploier in sod. 2014. Vir slike: Wolinski, 2015.

V primeru, ko kvasovke potrebujejo sterole, MK ali diacilglicerol za sintezo membranskih lipidov ali produkcijo energije, iz lipidnih kapelj mobilizirajo TAG in SE (Athenstaedt in Daum, 2003, 2005). Ve o metabolizmu in razgradnji posameznih vrst lipidov je opisano v naslednjih dveh poglavjih. Lipidne kaplje so poleg skladi- enja lipidov udeležene -e pri mnogih drugih procesih, eden od teh je posredna vloga lipidnih kapelj pri vzdrfvanju fluidnosti membrane ob prisotnosti zunanjih MK (Kohlwein in sod., 2012; Connerth in sod., 2010).

Lipidne kaplje sodelujejo tudi v procesih, ki niso povezani z lipidnim metabolizmom. Njihova predpostavljena vloga je za asno shranjevanje agregatov proteinov ali nepravilno

zvitih proteinov (Fei in sod., 2009). Zadnje -tudije zaradi interakcije z endoplazemskim retikulumom, peroksisomi, in mitohonriji lipidne kaplje opisujejo kot dinami ne organele. Opisani so bili tudi novi faktorji, ki vplivajo na nastanek in dinamiko lipidnih kapelj (Adeyo in sod., 2011).

2.4.3.1 Metabolizem sterolnih estrov

SE nastanejo z aktivacijo MK, ve inoma palmitoil-CoA in oleil-CoA, s hidroksilno skupino na poziciji C3 sterolne molekule. Reakcijo katalizirata dva encima Are1 in Are2. Oba encima za substrat uporabljata ergosterol, vendar Are1 preferen no esterificira sterolne intermediate kot je lanosterol (Yang in sod., 1996; Zweytick in sod., 2000). Ob standardnih pogojih gojenja kvasnih celic deluje Are2 kot glavni encim za sintezo SE. V anaerobnih pogojih, ko je biosinteza ergosterola blokirana, pa je pove ano delovanje Are1 in s tem zaestritev prekursorjev ergosterola (Valachovic in sod., 2001). V dvojni delecijski mutanti *are1Δare2Δ*, ki raste normalno, je sinteza SE popolnoma zavrta, kar kafe na to, da sta Are1 in Are2 edina proteina, ki sodelujeta pri biosintezi SE pri kvasovki. V tak-nih sevih je sterolna biosinteza zmanj-ana, vendar je povi-an nivo prostih sterolov (Zweytick in sod., 2000). Do zdaj opisano kafe na to, da sta sterolna biosinteza in nastanek SE povezana preko regulatornega mehanizma. Slednje podpira tudi ugotovitev, da je v dvojni mutanti *are1Δare2Δ* izraflanje proteina Erg3, encima pomembnega za sintezo sterolov, zmanj-ano in da je skvalenska epoksidaza Erg1 destabilizirana, kar vodi v zaustavitev sinteze sterolov (Arthington-Skaggs in sod., 1996; Sorger in sod., 2004). Tudi Arv1, protein za znotrajceli ni in eksogeni transport sterolov, je nujno potreben v odsotnosti sterolne esterifikacije ó delecija *ARV1* v dvojni mutanti *are1Δare2Δ* je letalna (Tinkelenberg in sod., 2000).

Cepitev SE na sterole in proste MK poteka s hidrolazami Tgl1, Yeh1 in Yeh2 (Koffel in sod., 2005; Mullner in sod., 2005). Protein Tgl1 in Yeh1 se nahajata v lipidnih kapljah, Yeh2 pa je pri standardnih pogojih na obrobju celice, najverjetneje na celi ni membrani. Mutanta *tgl1Δyeh1Δyeh2Δ* popolnoma izgubi zmofnost za razgradnjo SE, kar kafe na to, da so geni *TGL1*, *YEH1* in *YEH2* edini, ki v kvasovki kodirajo hidrolaze SE (Koffel in sod., 2005). V anaerobnih pogojih poteka razgradnja SE samo s pomo jo encima Yeh1. Drugi dve hidrolazi pa sta neaktivni (Koffel in Schneiter, 2006). Cikel esterifikacije prostih sterolov in hidroliza SE sta pomembni za ravnovesje prostega ergosterola (Wagner in sod., 2009).

2.4.3.2 Metabolizem triacilglicerolov

TAG nastanejo s pomo jo aciltransferaz Dga1 in Lro1. Neposredni prekursor za nastanek TAG je diacilglicerol (DAG), ki izhaja iz razli ni virov. Lahko nastane (1) z defosforilacijo *de novo* sintetizirane fosfatidne kisline, (2) z razgradnjo FL s fosfolipazami ali z (3) deacetilacijo TAG (Sl. 8) (Henry in sod., 2012). Nedavno so Kohlwein in sod.

(2010) prvotno opisani vlogi TAG kot zalofnih lipidov dodali –e druge vloge. Opisali so vpletenost TAG pri metabolizmu fleleza, FL in SL, pri lipotoksi nosti in celi nem ciklu.

Razgradnja TAG pote e z lipazami Tgl3, Tgl4 in Tgl5, ki se nahajajo v lipidnih kapljah oziroma so shranjene v endoplazemskem retiklu, e lipidnih kapelj ni (Athenstaedt in Daum, 2003, 2005; Schmidt in sod, 2013). Tudi Ayr1 deluje kot lipaza TAG (Ploier in sod., 2013).

2.5 POMEN POZNAVANJA LIPIDNEGA METABOLIZMA KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

Biosinteza in shranjevanje nepolarnih lipidov, kot so TAG in SE, sta zaradi napak v procesih, ki se pri loveku kafejo kot bolezni, v zadnjih desetletjih predmet vedno ve ih raziskav, med drugim tudi na modelnem organizmu *S. cerevisiae* (Koch in sod., 2014). Lipidi kvasovke so pomembni tudi z vidika biotehnologije. Zaradi dobro ohranjenih mehanizmov lipidnega mezabolizma med evkarionti so kvasovke pomemben sistem za biotehno-ko produkcijo industrijsko in farmacevtsko pomembnih lipidnih molekul (Uemura, 2012).

2.5.1 Lipidi in zdravje

Lipidom v zadnjih desetletjih zaradi pomena za zdravje oziroma bolezni raziskovalci posve ajo vedno ve pozornosti (Klug in Daum, 2014). Nara–anje delefa ljudi s prekomerno telesno tefo in hkrati podalj–evanje flivljenjske dobe postaja eden glavnih dejavnikov tveganja za razvoj z lipidi povezanih bolezni in tako velik zdravstveni problem dana–njega asa. Metabolni sindrom, sladkorna bolezen in kardiovaskularne bolezni so postale problem tako za posameznika, kot tudi za drufbo (Garbarino in Sturley., 2009). Prav zaradi tega je interes za poznavanje mehanizmov, ki neposredno povzro ajo patologijo ali do nje posredno privedejo, velik. Druga no delovanje celic ali/in organov zaradi motenj v homeostazi lipidov in lipidnem metabolizmu se prav tako kot pri bolezni, pogosto kon a s celi no smrtjo. Povezava med lipidi in celi no smrtjo je kompleksna in najverjetneje zajema razli ne mehanizme, ki jih –ele za enjamo razumevati. Lipotoksi nost se v splo–nem nana–a na toksi ne posledice, ki jih povzro a nalaganje lipidov, pogosto je to nalaganje prostih MK v neadipoznih tkivih kot so trebu–na slinavka, srce, ledvica, jetra in stene fil. (Unger in Orci, 2002; Schaffer, 2003; Brookheart in sod., 2009).

Shranjevanje prostih MK v nevtralnih lipidih je u inkovita obramba pred lipotoksi nostjo (Listenberger in sod., 2003; Garbarino in Sturley, 2009). Presefne proste ma– obne kisline pa naj bi povzro ale celi ne disfunkcije, ki vodijo do indukcije apoptoze, poimenovane lipoapoptoza, ali pa do drugih tipov celi ne smrti kot je tudi nekroza (Navina in sod., 2011; Khan in sod., 2012). Celi na smrt, sproflena s prostimi ma– obnimi kislinami, naj bi bila

odgovorna za propad beta celic trebu-ne slinavke pri diabetesu tipa II. Polega tega pa proste MK vplivajo tudi na propadanje hepatocit, sr nih mi-ic in ledvi nih parenhimskih celic in tako vplivajo tudi na druga patolo-ka stanja (Brookheart in sod., 2009).

Garbarino in Sturley (2009) sta pokazala, da lipotoksi nosti ne povzro ajo le proste MK, temve tudi druge vrste lipidov. Celi no smrt lahko v razli nih celi nih kulturah povzro i prost holesterol ali oksidirani lipoproteini. Vedno ve je dokazov, da pri boleznih, povezanih z lipidi, tudi SL, FL in kardiolipin vodijo do stresa in celi ne smrti (Schaffer, 2003; Brookheart in sod., 2009; Garbarino in sod., 2009). Lipidni metabolizem, vklju no z lipolizo in oksidacijo MK, mogo e prispeva k mehanizmom, ki so nepogre-ljivi za preflivetje celice. To so potreba po energiji, oskrba z metaboliti in njihovo nadome-anje ter nenazadnje signaliziranje z lipidi (Zechner in sod., 2012).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema in potro-ni material

Preglednica 1: Uporabljena laboratorijska oprema in potro-ni material ter proizvajalec materiala.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
aluminijasta folija	Magrit
analitska tehnica	A&D Instruments
aparatura za fotografiranje agaroznih gelov	UVItec
avtoklav Varioklav®	HP Medizintechnik
avtoklavirni trak	Steriking®
avtomatska pipeta (do 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 1 µl)	Gilson
brezpra-na komora MC 9-1, digestorij	Iskra
brizga (5 ml, 10 ml)	Dickinson and Company
centrifuga 5415R, namizna centrifuga, multikanalna avtomatska pipeta	Eppendorf
centrifuga Rotina 380R	Hettich Zentrifugen
falkonke (do 15 ml, do 50 ml)	TPP, Greiner Bio One
filter Minisart z velikostjo por 0,2 µm, steklene kroglice	Sigma-Aldrich
filtrirni papir	
gorilnik s plinsko kartu-o	Campingaz®
hladilnik (4 °C)	Gorenje
inkubator za bakterije (37 °C)	Binder
izvor napetosti za agarozno gelsko elektroforezo	Consort
kivete	Ratiolab
konfokalni mikroskop Cell observer	Zeiss
ledomat	Scotsman
magnetno me-alo	Variomag®
magnetno me-alo Rotamix S-10, tehnica	Tehtnica
merilni valji (do 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l), plasti ne posodice za tehtanje	Isolab
mikrovalovna pe ica	Daewoo
naprava za verifno reakcijo s polimerazo PCR System 2720	Applied Biosystems
nastavki za avtomatsko pipeto, mikrocentrifugirke 1,5 ml	Biohit, Sarstedt
nitrocelulozna membrana	Serva
papirnate brisa e	Premium
parafilm	Bemis
pH meter	Mettler
pinceta	Allgaier
plasti na folija	Paclan
rezervoar za dH ₂ O	Millipore
rezervoar za MQ	Progard®
rokavice	Kimtech
skalpel	Medicon
opti ni bralnik	Epson
spektrofotometer	Pharmacia Biotech
spektrofotometer NanoDrop s programsko opremo, kadi ka za elektroforezo na agaroznem gelu (velika/majhna)	Thermo Scientific

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1. Uporabljena laboratorijska oprema in potro-ni material ter proizvajalec materiala.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
spektrofotometer Sunrise, spektrofotometer Infinite M1000	Tecan
stekelci (-irina 0,75 mm) za AGE gel, glavni ek za flepke v gelu, stojalo za strjevanje gela, kadi ka za AGE in WB, izvor napetosti za PAGE elektroforezo in WB, kle- e za WB, gobice, aparaturna za zajemanje signalov iz nitrocelulozne membrane pri WB	BIO-RAD
steklene pipete (do 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml), a-e (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l), stojalo za mikrocentrifugirke in falkonke, PCR mikrocentrifugirke, objektno stekelce, krovno stekelce, avtomatska pipeta accu-jet®pro, mikrotitrna plo- ica s 96 vdolbinicami (prozorna/ rna)	Brand
steklovina: steklen triangel (spatula po Drigalskem), steklena epruveta s pokrov kom, steklene petrijevke, steklenice s pokrov kom, steklene erlenmajerice (100 ml, 200 ml, 2 l)	Simax, Boral, IJS
plasti na kadi ka za kemikalije	
sterilne plasti ne petrijevke	Golias
stresalnik za kvasovke (30 °C)	New Brunswick Scientific
stresalnik za kvasovke (ST), orbitalni stresalnik CERTOMAT®, stresalnik za bakterije (37 °C)	B. Braun
stresalnik/inkubator za kvasovke (30 °C)	Memmert
-katlica za nitrocelulozno membrano pri WB Perfect Western™	GenHunter
termoblok CH-100	Bioer
Transiluminator Visi-Blue™	UVP®
vibracijski me- alnik, centrifuga Combi-spin	Biosan
zamrzovalnik (-20 °C)	Liebherr
zamrzovalnik (-80 °C)	Heto
flamet	
fli ke za tehtanje	Bochem

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 2: Uporabljene kemikalije in proizvajalec kemikalij.

Kemikalija	Proizvajalec
40 % poliakrilamid, D-(+) glukoza monohidrat, bromfenol modro, inozitol, fenol	Fluka
absolutni etanol	Carlo Erba
agar, Tween® 20, -merkaptioetanol, pepton, kvasni ekstrakt, agarozna, DMSO, MES, litijev acetat, kalijev acetat, kloroform, LiCl, MgCl ₂ , amonijev persulfat, Nile Red, aminokislina: adenin, alanin, asparagin, aspartat, cistein, glutamin, glutamat, glicin, inozitol, izolevcin, levcin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirozin, uracil, valin, histidin	Sigma
Coomassie modro, natrijev acetat	Kemika
CSM me-anica aminokislin (brez Ura ali brez Leu), YNB brez aminokislin in z amonijevim sulfatom	Formedium
D-(+)-galaktoza, izopropanol, MgSO ₄ , natrijev klorid, ksilen modro, formamid, ss-DNA (2mg/ml)	Sigma-Aldrich
dH ₂ O, MQ	IJS
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNaseZap®	Thermo Scientific
EDTA, glicin, Tris, SDS, TEMED, PEG 3350	Serva

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem.

Kemikalija	Proizvajalec
glicerol, NaOH	AppliChem
metanol, trikloro-očetna kislina, urea, oleinska kislina	Merck
nana-alni pufer SYBR® Safe DNA gel strain	Invitrogen
očetna kislina, klorovodikova kislina	J. T. Baker
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne
reakcijski pufer Q5, ligacijski pufer T4	Bio Labs
reakcijski pufer Taq, restrikcijski pufer Fast Digest, 6x nana-alni pufer	Fermentas
substrat za WB Lumi-Light ^{PLUS}	Roche
teko i du-ik	Messer
varikina	TMampionka

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 3: Raztopine in pufri uporabljeni v magistrskem delu.

Raztopina/pufer	Sestavine
1 % agarozni gel	1 g agaroz, do 100 ml 1x TAE pufer, 10 µl SYBR® Safe
10x SDS	30,3 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS
10x TBS	60,6 g Tris, 87,66 g NaCl, dH ₂ O do 1 l (pH 7,6)
10x Towbin Western	30,3 g Tris, 144 g glicin, 100 ml 10 % SDS, dH ₂ O do 1 l (pH 7,6)
12 % lo evalni gel za urea-PAGE	12,6 g urea (7 M), 9 ml 40 % poliakrilamid, 3 ml 5x pufer TBE in MQ do 30 ml, pred ulitjem smo dodali -e 10 % APS (75 µl) in TEMED (7,5 µl)
12 % lo evalni gel za urea-PAGE-APM	12,6 g urea (7 M), 9 ml 40 % poliakrilamida, 3 ml 5x pufra TBE in MQ do 30 ml, tik pred ulitjem smo dodali -e 10 % APS (75 µl) in TEMED (7,5 µl), APM 10 µg/ml
12,5 % lo evalni gel za NaDS-PAGE	za 15 ml: 4,688 ml 40 % poliakrilamid, 6,338 ml MQ, 3,75 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) in 150 µl 10 % SDS, pred ulitjem smo dodali -e 10 % APS (75 µl) in TEMED (7,5 µl)
1x pufer Towbin Western	100 ml 10x Towbin Western, 200 ml metanol, dH ₂ O do 1 l
1x TAE	2 M Tris, 17,5 mM CH ₃ COOH, 5 mM EDTA, dH ₂ O
1x TBS	100 ml 10x TBS, 900 ml dH ₂ O
1x TBST	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20
2x nana-alni pufer za urea-PAGE-APM	0,01 % SDS, 0,01 % bromfenol modro, 0,005 % ksilen modro, 0,05 mM EDTA, 47,5 % formamid
4 % nana-alni gel za NaDS-PAGE	za 5 ml: 500 µl 40 % poliakrilamid, 3,175 ml MQ, 1,250 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) in 50 µl 10 % SDS, tik pred ulitjem smo dodali -e 10 % APS (25 µl) in TEMED (5 µl)
4 % nana-alni gel za urea-PAGE-APM	6,3 g urea, 1,5 ml 40 % poliakrilamid, 1,5 ml 5x pufer TBE in MQ do 15 ml, tik pred razlitjem smo dodali 10 % APS (75 µl) in TEMED (7,5 µl)
4x redukcijski nana-alni pufer za NaDS-PAGE	1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 0,25 ml MQ, 2 ml glicerol, 1 ml 10 % SDS, 0,5 ml DTT (0,1543 g/0,5 ml), bromfenol modro
50x TAE pufer za AGE	242 g Tris, 17,5 mM CH ₃ COOH, 5 mM EDTA, dH ₂ O do 1000 ml (pH 8,0)
Coomassie modro	raztopljene tablete Coomassie modro in 20 % očetna kislina v razmerju 1:1

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Raztopine in pufri uporabljeni v magistrskem delu.

Raztopina/pufer	Sestavine
elektroforezni pufer 1x SDS nana-alni pufer za NaDS-PAGE	100 ml 10x SDS, 900 ml dH ₂ O 1ml 1x SDS pufra (60 mM Tris (pH 6,8), 3 % SDS, 10 % glicerol, 0,05 % Bromfenol modro), 50 µl -merkaptoetanol, 100 µl 1M Tris (pH 8)
pufer AEMgCl ₂ pufer AEMgCl ₂ (solni)	50 mM natrijev acetat, 10 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA 50 mM natrijev acetat, 10 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl
pufer za blokiranje (WB) pufer za izolacije genomske DNA iz kvasovk pufer za razbijanje kvasnih celic raztopina s primarnimi protitelesi (WB)	5 % posneto mleko v prahu v TBST 1 % SDS, 0,2 M litijev acetat 0,2 M NaOH, 0,2 % -merkaptoetanol 2 % posneto mleko v prahu v TBST, primarna protitelesa (red itev 1:1000)
raztopina s sekundarnimi protitelesi (WB)	5 % posneto mleko v prahu v TBST, sekundarna protitelesa (red itev: 1:10000)
raztopina za razbarvanje gela (NaDS-PAGE) zmes dNTP za reakcijo PCR	30 % etanol, 10 % očetna kislina 10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP

3.1.4 Komercialni kompleti reagentov

Preglednica 4: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti reagentov in njihov proizvajalec.

Ime kompleta	Uporaba	Proizvajalec
Pierce [®] 660nm Protein Assay Kit	Dolo anje koncentracije proteinov.	Thermo Scientific
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Izolacija plazmida iz bakterij in kvasovk.	QIAGEN
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Izolacija DNA iz agaroznega gela.	QIAGEN
QIAquick [®] PCR purification Kit	i- enje produkta restrikcije.	QIAGEN

3.1.5 Plazmidni vektorji

Preglednica 5: Uporabljeni plazmidni vektorji.

Plazmid	Opombe in vir
pABY1653	Izhaja iz pRS425. Vklju ek: tE ^{UUC} -tK ^{UUU} -tQ ^{UUG} . <i>LEU2</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: Univerza Umea, Tvedska
pABY525	Izhaja iz pRS425. Prazen vektor za kontrolo. <i>LEU2</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: Univerza Umea, Tvedska
pAG25	Vsebuje rezisten no kaseto <i>natMX</i> (gen <i>NAT1</i> iz <i>Streptomyces noursei</i> , ki kodira nourseotricin N-acetil-transferazo) za odpornost proti antibiotiku nourseotricinu (clonNAT). Vir: IJS.
pAG25- <i>GAL1pr-TST</i>	Izhaja iz pAG25 in ima v restrikcijsko mesto <i>SalI</i> vstavljeno kaseto <i>GAL1pr-TST</i> . Vir: konstruirali sami.
pCAU	Izhaja iz pCAUG in ima inaktiviran zapis za izraflanje GFP med dvema <i>SphI</i> restrikcijskima mestoma. <i>URA3</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: IJS
pCAU- <i>TST</i>	Izhaja iz plazmida pCAU. Med mesti <i>EcoRI</i> in <i>HindIII</i> ima vstavljen zapis za <i>TST</i> . Plazmid smo konstruirali s homologno rekombinacijo. <i>URA3</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: konstruirali sami.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5. Uporabljeni plazmidni vektorji.

Plazmid	Opombe in vir
pCAU- <i>TUM1</i>	Izhaja iz plazmida pCAU. Med mesti <i>EcoRI</i> in <i>HindIII</i> oziroma pred <i>ADHI</i> promotor ima vstavljen zapis za <i>TUM1</i> . Plazmid je konstruiran s homologno rekombinacijo. <i>URA3</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: IJS
pRD53	Izhaja iz plazmida pRS316 in ima med mesti <i>SpeI</i> in <i>BamHI</i> vstavljen inducibilni promotor gena <i>GALI</i> . <i>URA3</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: IJS.
pRD53- <i>TST</i>	Izhaja iz pRD53 in ima v <i>BamHI</i> restrikcijsko mesto vstavljen <i>TST</i> . Vir: konstruirali sami.
pSH47	Vsebuje zapis za Cre rekombinazo, ki se nahaja za inducibilnim <i>GALI</i> promotorjem. <i>URA3</i> avksotrofni ozna evalec za selekcijo. Vir: IJS.

3.1.6 Genski zapisi

Preglednica 6: Uporabljeni genski zapisi.

Ime	Opis in vir
<i>TST</i>	cDNA mi-je-ga gena <i>TST</i> (Gene ID: 22117) Vir: prof. dr. Simon Horvat, Kemijski in-titut, Ljubljana.
<i>KanMX</i>	Zapis za odpornost proti antibiotiku G418. Zapis <i>KanMX</i> , ki vsebuje tudi lox restrikcijski mesti, izhaja iz plazmida pYGFpG _N . Vir: IJS.

3.1.7 Encimi

Preglednica 7: Uporabljeni encimi.

Encim	Proizvajalec
Ligaza T4	Thermo Scientific
Q5 Hot Start High-fidelity DNA polimeraza	Bio Labs
Taq DNA polimeraza	Thermo Scientific
<i>Sall</i> FastDigest™	Fermentas
<i>SfiI</i>	Fermentas
<i>HindIII</i> FastDigest™	Fermentas
<i>XbaI</i> FastDigest™	Fermentas
<i>XhoI</i> Fast Digest™	Fermentas

3.1.8 Za etni oligonukleotidi

Pri magistrskem delu smo uporabili naslednje za etne oligonukleotide: TST_A_F, TST_A_R, UP_KanMX_F, DN_KanMX_R, TST_B_F, TUM1_del_rev, Nov_TUM1_k_R, j_KanMX_F, Nov_TUM1_k_F, j_KanMX_R, Nov_TUM1_k_R, 01_mTst.F, 01_mTst.R, 02_mTst.F, 02_mTst.R, TST_pRD53_F, TST_pRD53_R, GALpr_TST_F, GALpr_TST_R, I_GAL_R, I_GAL_UNI_L, K_GAL_L, K_GAL_R, PR_I_ZA_L, PR_I_ZA_R, PR_I_PRED_L, PR_I_PRE_R.

Oligonukleotidi so natan neje opisani v Prilogah (Pregl. A).

3.1.9 Organizmi

3.1.9.1 Sevi kvasovk

Preglednica 8: Uporabljeni sevi kvasovk.

Sev	Genotip	Vir
Sev divjega tipa BY4741	<i>MATa his3\hat{e}1 leu2\hat{e}0 met15\hat{e} ura3\hat{e}0</i>	Euroscarf
BY4741 [pCAU]		Konstruirali sami
BY4741 [pCAU- <i>TUM1</i>]		IJS
BY4741 [pCAU- <i>TST</i>]		Konstruirali sami
BY4741 [pABY525]		Konstruirali sami
BY4741 [pABY1653]		Konstruirali sami
BY4741 <i>tum1\hat{e}</i>	<i>MATa his3\hat{e}1 leu2\hat{e}0 met15\hat{e} ura3\hat{e}0 tum1\hat{e}</i>	IJS
BY4741 <i>tum1 ::TST</i>	<i>MATa his3\hat{e}1 leu2\hat{e}0 met15\hat{e} ura3\hat{e}0 TST</i>	Konstruirali sami
BY4741 <i>tum1 mfa1</i>	<i>MATa his3\hat{e}1 leu2\hat{e}0 met15\hat{e} ura3\hat{e}0 tum1\hat{e} mfa1</i>	Konstruirali sami
<i>::GAL1pr-TST-NatMX</i>		
BY4741 <i>tum1\hat{e}</i> [pCAU]		Konstruirali sami
BY4741 <i>tum1\hat{e}</i> [pCAU- <i>TUM1</i>]		Konstruirali sami
BY4741 <i>tum1\hat{e}</i> [pCAU- <i>TST</i>]		Konstruirali sami
BY4741 <i>tum1</i> [pABY525]		Konstruirali sami
BY4741 <i>tum1</i> [pABY1653]		Konstruirali sami
BY4741 <i>uba4</i>	BY4741 <i>MATa his3 leu2 ura3 met15 uba4\hat{e}::Kan^R CAN1 LYP1</i>	Euroscarf-ova zbirka SKO
BY4741 <i>ncs2Δ</i>	BY4741 <i>MATa his3 leu2 ura3 met15 ncs2\hat{e}::Kan^R CAN1 LYP1</i>	Euroscarf-ova zbirka SKO
BY4741 <i>ncs6Δ</i>	BY4741 <i>MATa his3 leu2 ura3 met15 ncs6\hat{e}::Kan^R CAN1 LYP1</i>	Euroscarf-ova zbirka SKO
BY4741 <i>uba4</i> [pABY525]		Konstruirali sami
BY4741 <i>uba4</i> [pABY1653]		Konstruirali sami
BY4741 <i>urm1Δ</i>	BY4741 <i>MATa his3 leu2 ura3 met15 urm1\hat{e}::Kan^R CAN1 LYP1</i>	Euroscarf-ova zbirka SKO
BY4743	<i>MATa/ his3 1/his3 1 leu2 0/leu2 0 LYS2/lys2 0 met15 0/MET15 ura3 0/ura3 0</i>	Euroscarf
BY4743 [pCAU]		Konstruirali sami
BY4743 [pCAU- <i>TUM1</i>]		Konstruirali sami
BY4743 [pCAU- <i>TST</i>]		Konstruirali sami
BY4743 [pABY525]		Konstruirali sami
BY4743 [pABY1653]		Konstruirali sami
Y22507	BY4743 <i>MAT a/ his3\hat{e}1/his3\hat{e}1 leu2\hat{e}0/leu2\hat{e}0 lys2\hat{e}0/LYS2 MET15/met15\hat{e}0 ura3\hat{e}0/ura3\hat{e}0 YOR251c:: kanMX4/YOR251c</i>	Euroscarf
Y22507 [pCAU]		Konstruirali sami
Y22507 [pCAU- <i>TUM1</i>]		Konstruirali sami
Y22507 [pCAU- <i>TST</i>]		Konstruirali sami
Y22507 [pABY525]		Konstruirali sami
Y22507 [pABY1653]		Konstruirali sami
Y32507	BY4743 <i>MAT a/ his3\hat{e}1/his3\hat{e}1 leu2\hat{e}0/leu2\hat{e}0 lys2\hat{e}0/LYS2 MET15/met15\hat{e}0 ura3\hat{e}0/ura3\hat{e}0 YOR251c::kanMX4/YOR251c::kanMX4</i>	Euroscarf

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 8. Uporabljeni kvasni sevi.

Sev	Genotip	Vir
Y32507 [pCAU]		Konstruirali sami
Y32507 [pCAU- <i>TUM1</i>]		Konstruirali sami
Y32507[pCAU- <i>TST</i>]		Konstruirali sami
Y32507 [pABY525]		Konstruirali sami
Y32507 [pABY1653]		Konstruirali sami

3.1.9.2 Bakterijski sevi

Preglednica 9: Uporabljeni bakterijski sevi.

Sev	Genotip	Vir
DH5	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG 80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), ⁶</i>	IJS
One Shot Top 10	F ⁻ <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 nupG recA1araD139 (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1</i>	Invitrogen

3.1.10 Elektroforezni standardi

Preglednica 10: Uporabljeni elektroforezni standardi.

Elektroforezni standard	Proizvajalec
DNA standard Gene Ruler™ 1 kbp DNA Ladder	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Scientific

3.1.11 Goji- a

3.1.11.1 Goji- a za kvasovke

Preglednica 11: Uporabljena goji- a za rast kvasovk.

Ime goji- a	Sestava
Trdno YPD goji- e	Kvasni ekstrakt (10 g/l), pepton (20 g/l), agar (20 g/l), glukoza (20 g/l), dH ₂ O do 1 l.
Teko e YPD goji- e	Teko e YPD goji- e ne vsebuje agarja. Vse druge sestavine so enake kot pri trdnem YPD.
Teko e YP-Gal	2x YPD (brez glukoze), 2 % galaktoza, dH ₂ O.
Trdno YNB-ura goji- e	YNB brez AK in z AS (6,7 g/l), CSM brez Ura (0,67 g/l), glukoza (20 g/l), agar (20 g/l), MQ do 1 l.
Teko e YNB-ura goji- e	Teko e YNB-ura goji- e ne vsebuje agarja. Vse druge sestavine so enake kot pri trdnem YNB-ura.
Trdno oleatno goji- e	YNB brez AK in brez AS (6,7 g/l), 100 ml CSM (0,67 g/l), dopolnimo z MQ do 1 l. Po avtoklaviranju 200 ml osnove dodamo 200 µl sterilne oleinske kisline, 4 ml detergenta in 4 ml MES.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 11. Uporabljeni goji- a za rast kvasovk.

Ime goji- a	Sestava
Teko e YNB-leu goji- e	Teko e YNB-leu goji- e ne vsebuje agarja. Vse druge sestavine so enake kot pri trdnem YNB-leu.
Trdno YNB-leu goji- e	YNB brez AK in z AS (6,7 g/l), CSM brez Leu (0,67 g/l), glukoza (20 g/l), agar (20 g/l), MQ do 1 l.
Teko e goji- e-G418	Goji- u pred uporabo dodamo 0,6 mg/ml antibiotika G418.
Trdno goji- e-G418	Tik pred ulitjem plo- goji- u dodamo 0,6 mg/ml antibiotika G418
Teko e goji- e-clonNAT	Goji- u pred uporabo dodamo 0,1 mg/ml antibiotika clonNAT.
Trdno goji- e-clonNAT	Tik pred ulitjem plo- goji- u dodamo 0,1 mg/ml antibiotika clonNAT.
Minimalni medij NR	Glukoza (20 g/l), YNB brez AK in z AS (6,7 g/l), CSM brez Ura (0,67 g/l), me-anica AK (2 g/l), inozitol (8 mg/l) in MES (20 mM). Opomba: kon na koncentracija inozitola je 10 mg/l, ker sta 2 mg fle v YNB.

3.1.11.2 Goji- a za bakterije

Preglednica 12: Uporabljeni goji- a za rast bakterij.

Ime goji- a	Sestava
Trdno LB goji- e	Tripton (10 g/l), kvasni ekstrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l), agar (15 g/l), dH ₂ O do 1 l
Teko e LB goji- e	Teko e LB goji- e ne vsebuje agarja. Vse druge sestavine so enake kot pri trdnem LB.
Teko e LBA goji- e	Goji- u pred uporabo dodamo 0,2 mg/ml antibiotika ampicilina.
Trdno LBA goji- e	Tik pred ulitjem plo- (50 °C) goji- u dodamo 0,2 mg/ml antibiotika ampicilina.

3.1.12 Protitelesa

Preglednica 13: Uporabljeni protitelesa.

Protitelo	Proizvajalec
Primarna protitelesa Anti-TST [EPR1164G(B)]	RabMAb
Sekundarna protitelesa Goat Anti-rabbit pod [111-035-003]	Jackson ImmunoResearch

3.1.13 Homogenati

Preglednica 14: Uporabljeni homogenati.

Homogenat	Vir
mi-ja jetra	prof. dr. Simon Horvat, Kemijski in-titut, Ljubljana
mi-je ma- evje	prof. dr. Simon Horvat, Kemijski in-titut, Ljubljana

3.1.14 Antibiotiki

Preglednica 15: Uporabljeni antibiotiki

Antibiotik	Proizvajalec
Ampicilin	Sigma

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 15. Uporabljeni antibiotiki.

Antibiotik	Proizvajalec
geneticin G418 disulfat (<i>KanMX</i>)	Formedium
nourseotricin-clonNAT (<i>NatMX</i>)	Werner

3.1.15 Ra unalni-ki programi

Preglednica 16: Uporabljeni ra unalni-ki programi.

Ime programa	Namen uporabe
ApE	Sestavljanje genskih zapisov in plazmidov <i>in situ</i> , izdelava restriskcijskih map.
Excel	Urejanje in statisti na obdelava podatkov.
Word	Pisanje magistrskega dela.
UVIPhoto	Programska oprema za slikanje gelov.
ChemiDoc™ MP Imaging System	Programska oprema za slikanje nitroceluloznih membran.
Tecan Infinite M	Programska oprema za dolo anje koncentracije proteinov.

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija steklovine, goji- in raztopin

Material za sterilno delo (nastavki za avtomatske pipete, mikrocentrifugirke, merilni valji in druga oprema) in vsa goji- a smo sterilizirali v avtoklavu z vlahno toploto (121 °C, 20 min). Prav tako smo v avtoklavu z vlahno toploto sterilizirali odpadke (134 °C, 15 min).

Opremo za izolacijo tRNA smo suho sterilizirali (3 h pri 180 °C).

Temperaturno ob utljive snovi smo sterilizirali s pomo jo filtra s premerom por 0,2 µm (Sigma-Aldrich).

3.2.2 Priprava goji-

3.2.2.1 Goji- a za rast bakterij

Razli na teko a in trdna goji- a za rast bakterij smo pripravili iz sestavin, ki so opisane v Preglednici 12. Pred uporabo smo goji- a sterilizirali v avtoklavu z vlahno toploto (20 minut, 121 °C, 1,2 bar), potem pa smo jih do uporabe hranili na sobni temperaturi. Teko e ali trdno goji- e LBA smo pripravili tako, da smo goji- u LB po avtoklaviranju in ohladitvi na 50 °C dodali antibiotik ampicilin (kon na koncentracija v goji- u je 0,1 mg/ml).

3.2.2.2 Goji- a za rast kvasovk

Razli na teko a in trdna goji- a za rast kvasovk smo pripravili iz sestavin, ki so opisane v Preglednici 11. Sterilizirali smo jih v avtoklavu z vlažno toploto (20 minut, 121 °C, 1,2 bar). Po avtoklaviranju smo s pomo jo me-anja z magnetnim me-alom goji- a ohladili do 50 °C, jim po potrebi dodali ustrezne antibiotike (G418 v kon ni koncentraciji 0,4 mg/ml, clonNAT v kon ni koncentraciji 0,1 mg/ml) in razlili v plo- e. Teko a goji- a smo do uporabe hranili na sobni temperaturi.

Osnovo za posebno minimalno goji- e za metodo Nile red smo pripravili iz glukoze (20 g/l), YNB brez AK in z AS (6,7 g/l), CSM brez Ura (0,67 g/l) in me-anice AK (2 g/l). Po avtoklaviranju smo osnovi dodali -e dve sterilni komponenti: inozitol (kon na koncentracija 8 mg/l) in MES (kon na koncentracija 20 mM). Ker YNB fle vsebuje inozitol, je bila kon na koncentracija inozitola v goji- u 10 mg/l.

3.2.3 Delo z bakterijami

3.2.3.1 Gojenje in vzdrfevanje bakterijskih celic

Bakterijske celice smo gojili na trdnem goji- u LB v inkubatorju pri 37 °C ali v teko em goji- u LB v stresalniku pri 37 °C in 250 rpm. Za selekcijo bakterijskih sevov smo goji- u LB dodali antibiotik ampicilin.

Za kratek as smo plo- e z bakterijskimi kulturami shranjevali pri 4 °C. Trajno smo bakterijske kulture, tako kot kvasovke, shranjevali v 25 % glicerolu pri -80 °C.

3.2.4 Delo s kvasovkami

3.2.4.1 Gojenje in vzdrfevanje kvasne kulture

Kvasovke smo namnofili v teko em ali na trdnem goji- u YPD, v minimalnem goji- u z dodanimi ustreznimi aminokislinami in glukozo kot glavnim virom ogljika ali v drugem selekcijskem goji- u z dodanimi antibiotiki pri 30 °C.

Prekono no kulturo smo pripravili tako, da smo s pomo jo sterilnega nastavka za avtomatsko pipeto nacepili kvasovke iz trdnega goji- a v teko e goji- e YPD ali v drugo selekcijsko goji- e. Inkubirali smo jo v stresalniku (250 rpm) preko no i pri 30 °C.

Kvasovke smo za kratek as shranjevali na trdnih goji- ih pri 4 °C in jih ohranjali s precepljanjem na svefle plo- e. Trajno smo seve hranili pri -80 °C. Seve za trajno hranjenje smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirki sterilno zme-ali 650 µl 50 % glicerola in 350 µl prekono ne kulture seva kvasovke. Ko smo fleleli uporabiti seve, zamrznjene pri -80 °C, smo jih najprej s pomo jo sterilnega nastavka za avtomatsko pipeto prenesli na

svefle trdno goji- e in tako preverili viabilnost kvasnih celic, potem pa jih namnofili v teko em goji- u.

Vzorec za po-iljanje po po-ti smo pripravili v mikrocentrifugirki iz 10 μ l prekono ne kulture kvasovk in 100 μ l sveflega ustreznega goji- a. Mikrocentrifugirko smo ovili s parafilmom.

3.2.4.2 Merjenje opti ne gostote kvasne kulture

V kiveti smo pripravili 1 ml vzorca kvasne kulture. Za posamezne vzorce smo pred meritvami naredili kalibracijo. Po potrebi smo vzorec red ili in pri meritvah upo-tevali faktor red enja. Opti no gostoto (OD) smo merili pri 600 nm.

3.2.4.3 Meritev hitrosti rasti kvasnih celic ali izdelava rastnih krivulj

Na mikrotitrni plo- i smo pripravili prekono ne kulture sevov, ki so nas zanimali. To smo naredili tako, da smo v 200 μ l goji- a v posameznem jamici na plo- i, nacepili posamezen sev in inkubirali na 30 °C preko no i. Drugi dan smo v novo sterilno mikrotitrno plo- o dali 198 μ l sveflega goji- a in 2 μ l prekono ne kulture posameznega seva. Po obeh korakih smo plo- o prekrili z membrano. Membrana dopu- a izmenjavo plinov, hkrati pa vzdrfluje sterilno okolje v mikrotitrni plo- ici.

Za izdelavo rastnih krivulj smo uporabili spektrofotometer s pripadajo o programsko opremo in program Excel. Meritve smo izvajali pri 30 °C, skrajni temperaturi za rast sta bili 29 °C in 31 °C. Tvevilo ciklov merjenja se je razlikovalo, spreminjali smo ga glede na pri akovano hitrost rasti sevov. asovni interval za meritve je bil 121 s. Absorbanco smo merili pri 595 nm.

3.2.4.4 Preverjanje uspe-nosti rasti sevov kvasovk na trdnem goji- u z oleatom

Najprej smo naredili prekono ne kulture preverjanih sevov v goji- u YPD. Naslednji dan smo vse kulture red ili do $OD_{600}=0,01$. Tako razred ene kulture v kon nem volumnu 10 ml (YPD goji- a in prekono na kultura) smo v erlenmajericah stresali 14 h pri 30 °C in 250 rpm. Po inkubaciji smo kulture kvasnih celic centrifugirali za 5 min pri 4400 rpm na sobni temperaturi, odstranili goji- e in nato -e dvakrat sprali s sterilno vodo. Celice smo s sterilno vodo razred ili na $OD_{600}=1$ (kon ni volumen 10 ml). Naredili smo -tiri red itve: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Na trdno goji- e smo nanegli 3 μ l za vsako od -tirih red itev posameznega seva. Ustrezne red itve kvasnih celic smo hkrati nanegli na goji- e YPD (kontrola) in oleatno goji- e. Priprava in sestava oleatnega goji- a je opisana v poglavju 3.2.1. Rezultate smo zabeleffili s fotoaparatom.

3.2.5 Osnovne metode molekulskega kloniranja

V nadaljevanju so natan no opisane metode molekulskega kloniranja, s katerimi smo pripravili genske konstrukte, uporabljene v magistrskem delu.

3.2.5.1 Izolacija genomske DNA iz kvasovk

Genomsko DNA smo iz kvasovk izolirali po prilagojenem protokolu Looke in sod. (2011). Kvasno kolonijo smo ob sterilnih pogojih prenesli v mikrocentrifugirko s 200 μ l pufra (1 % SDS in 0,2 M litijev acetat), jo resuspendirali ter nato za 5 min inkubirali pri 70 °C. Dodali smo 300 μ l ohlajenega absolutnega etanola in vsebino v mikrocentrifugirki preme-ali s pomo jo vibracijskega me-alnika. Sledilo je 3-minutno centrifugiranje v namizni centrifugi pri 1420 rpm. Odstranili smo supernatant in pelet sprali s 500 μ l 70 % etanola. Spran pelet smo raztopili v 100 μ l MQ in centrifugirali za 15 s. Iz zgornjega dela supernatanta smo previdno odpipetirali 40 μ l. Slednje je predstavljal na- vzorec genomske DNA iz kvasovke, ki smo ga uporabili kot matri no DNA za verifno reakcijo s polimerazo.

3.2.5.2 Izolacija plazmidne DNA iz kvasovk

Za izolacijo smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAquick® Spin MiniPrep Kit (QIAGEN). Navodila proizvajalca smo prilagodili za izolacijo plazmidne DNA iz kvasovk.

5 ml prekono ne kulture seva kvasovke smo prelili v falkonko in centrifugirali (4 °C, 4400 rpm, 10 min), nato smo odlili supernatant in celice resuspendirali v 1 ml sterilne MQ ter vse prenesli v mikrocentrifugirko. Celice v mikrocentrifugirki smo -e enkrat centrifugirali (1420 rpm, 5 min) in resuspendirali v 250 μ l pufra P1 in nato prenesli v vialo s pokrov kom na navoj. Pomembno je bilo, da smo vsebino v vialah dobro resuspendirali, da ni bilo videti delcev. Dodali smo 300 μ l s HCl spranih steklenih kroglic in 10 minut me-ali na vibracijskem me-alniku pri maksimalni mo i na sobni temperaturi. Dodali smo 250 μ l pufra P2, ponovno me-ali na vibracijskem me-alniku na sobni temperaturi za 2 minuti pri maksimalni mo i in nato inkubirali 5 minut na ledu. Nadaljevali smo po navodilih proizvajalca od to ke 3 do to ke 10. DNA smo eluirali v 80 μ l MQ, predhodno segrete na 60° C, inkubirali 3 min na sobni temperaturi in centrifugirali (1420 rpm, 1 min). DNA smo oborili z absolutnim etanolom tako, da je bila kon na koncentracija etanola 70 %. DNA smo inkubirali preko no i na -20 °C, naslednji dan pa centrifugirali (1420 rpm, 4 °C, 5 min) in odstranili etanol. Po su-enju mikrocentrifugirke ob ognju smo DNA raztopili v minimalnem volumnu MQ.

3.2.5.3 Izolacija plazmidne DNA iz bakterij

Za izolacijo smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAquick® Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) in sledili navodilom proizvajalca. DNA smo eluirali s 35 μ l MQ.

3.2.5.4 Dolo anje koncentracije DNA

Koncentracijo in kakovost DNA smo dolo ili s spektrofotometrom NanoDrop. Na spektrofotometer NanoDrop smo nanegli 1 μ l vzorca DNA in izmerili absorbanco pri valovni dolfini 260 nm. Iz absorbance pri 260 nm smo dolo ili koncentracijo DNA vzorca. Iz razmerja med absorbancama pri 260 nm in 280 nm pa smo ocenili istost vzorca. Nadalje smo uporabili le vzorce DNA, ki so imeli razmerje 260/280 ve je od 1,8. Za kalibracijo smo uporabili MQ ali TE pufer, odvisno od tega, v em smo eluirali DNA. Aparaturo smo o istili z MQ.

3.2.5.5 Pomnoflevanje DNA z verifno reakcijo s polimerazo (PCR)

Z metodo PCR smo pomnoflili fragmente DNA, ki so nam sluffili za kloniranje ali za preverjanje sevov oziroma preverjanje uspe-nosti kloniranja. Pri posameznih reakcijah PCR smo uporabili specifi ne kombinacije za etnih oligonukleotidov, ki so navedeni v poglavju Materiali in natan neje opisani v prilogah.

Uporabili smo dve vrsti polimeraz: polimerazo Q5[®] Hot Start High-Fidelity (New England Biolabs) in polimerazo Taq (New England Biolabs). Polimerazo Q5 smo uporabili za pomnoflevanje fragmentov, ki smo jih kasneje uporabili za kloniranje, polimerazo Taq pa za kontrolne reakcije PCR. Koli ine posameznih komponent ter asovni in temperaturni profil reakcije PCR so odvisni od vrste polimeraze, ki smo jo uporabili (Pregl. 17-20).

Preglednica 17: Reakcijska zmes za verifno reakcijo z DNA polimerazo Q5[®].

Komponenta	Zalofna koncentracija	Volumen (μ l)
Matri na DNA	Razli na	2,5
Za etni oligonukleotid F	10 μ M	1,25
Za etni oligonukleotid R	10 μ M	1,25
Reakcijski pufer za Q5 polimerazo	5x	5
dNTP	1,25 mM	4
DMSO		1,25
Polimeraza Q5 Hot Start High-Fidelity	1x	0,25
MQ		9,5
Skupni volumen		25

Preglednica 18: Temperaturni in asovni profil verifne reakcije z DNA polimerazo Q5[®].

Stopnja	Temperatura	as
Za etna denaturacija	98 $^{\circ}$ C	30 s
35 ciklov	1. Denaturacija	98 $^{\circ}$ C
	2. Prileganje za etnih oligonukleotidov	Tm \pm 5 $^{\circ}$ C
	3. Podalj-evanje	72 $^{\circ}$ C
Kon no podalj-evanje	72 $^{\circ}$ C	2 kbp/min
Konec	4 $^{\circ}$ C	0

Preglednica 19: Reakcijska zmes za verifno reakcijo z DNA polimerazo Taq.

Komponenta	Zalofna koncentracija	Volumen (μ l)
Matri na DNA	Razli na	2,5
Za etni oligonukleotid F	10 μ M	0,4
Za etni oligonukleotid R	10 μ M	0,4
Reakcijski pufer za Taq polimerazo	1x	2
MgCl ₂	25 mM	1,6
dNTP	1,25 mM	1,6
DMSO		1
Polimeraza Q5 Hot Start High-Fidelity	1x	0,2
MQ		10,3
Skupni volumen		20

Preglednica 20: Temperaturni in asovni profil verifne reakcije z DNA polimerazo Taq.

Stopnja	Temperatura	as
Za etna denaturacija	95 °C	5 min
35 ciklov	1. Denaturacija	30 s
	2. Prileganje za etnih oligonukleotidov	Tm \pm 5 °C
	3. Podalj-evanje	72 °C
Kon no podalj-evanje	72 °C	10 min
Konec	4 °C	0

3.2.5.6 Agarozna gelska elektroforeza (AGE)

Uspe-nost reakcije PCR in uspe-nost restrikcije fragmentov DNA in plazmidnih vektorjev smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (AGE). Z njo smo po velikosti lo evali fragmente DNA na agaroznem gelu. Po detekciji DNA in primerjavi s standardi, smo lahko sklepali tudi na koncentracijo DNA v vzorcu. Pripravili smo 1 % agarozni gel, v 1x pufu TAE z 1x barvilom SYBR[®] Safe ter ga razlili v kadi ko za elektroforezo. Pred nanosom na gel smo vsakemu vzorcu dodali 6x nana-alni pufer (kon na koncentracija nana-alnega pufra je 1x). Kot standard smo uporabili lestvico GeneRuler[™] 1 kbp DNA Ladder. Koli ina vzorca, ki smo jo nana-ali v flepke, je bila odvisna od predvidene koncentracije DNA v vzorcu (od 2-7 μ l pri detekciji, do 25 μ l pri izolaciji DNA iz gela). Elektroforeza je potekala v 1x TAE pufu od 30 min do 2 uri pri konstantni napetosti 90-120 V. Gel smo si ogledali pod UV transiluminatorjem ali ga slikali.

3.2.5.7 i- enje fragmentov DNA iz agaroznega gela

Iz agaroznega gela smo s pomo jo skalpela izrezali fragmente DNA pri akovanih dolfin in jih prenesli v mikrocentrifugirke. Za i- enje fragmentov DNA iz agaroznega gela smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN). Izolacijo smo izvajali po navodilih proizvajalca. DNA smo eluirali z 35 μ l MQ, segreti na 60 °C. O i- eno DNA smo hranili pri -20 °C.

3.2.5.8 Transformacija kvasnih celic z metodo z litijevim acetatom

Prekono no kulturo primernege seva kvasovke smo v sveflem goji- u razred ili do $OD_{600}=0,1$ in stresali v stresalniku (250 rpm) pri 30 °C do $OD_{600}=0,5$ (YPD: 4 ure, da razra- amo za dva generacijska asa). 10 ml kulture v eksponentni fazi je zadostovalo za 3-4 transformacije.

Celice smo prenesli v 15 ml falkonko in centrifugirali (3000 rpm, 5 min, ST). Supernatant smo odstranili, usedlino s celicami pa resuspendirali v polovi nem volumnu vode. Ponovno smo centifugirali in resuspendirali v 1/20 prvotnega volumna 0,1 Li-acetata. Centrifugirali smo (1400 rpm, 1 min, ST) in resuspendirali v 200 μ l 0,1 M Li-acetata. Celice smo po potrebi razdelili v alikvote, centrifugirali, odstranili supernatant in drflali na ledu do transformacije.

Celicam smo dodali predpripravljeno (sterilno in homogeno) transformacijsko me-anico, ki je vsebovala 240 μ l 50% PEG 3350, 36 μ l 1 M Li-acetat, 50 μ l 2 mg/ml ss-DNA (predhodno 2 min kuhana pri 95 °C in prene-ena na led), transformirajo o DNA (najve 34 μ l) ter do volumna 360 μ l sterilne MQ. Transformacijsko me-anico s celicami smo preme-ali na vibracijskem me-alniku in jo nato inkubirali 30 minut pri 30 °C in nadaljnjih 30 minut pri 42 °C.

Po inkubaciji smo celicam dodali 700 μ l sterilne MQ, preme-ali in centrifugirali (3 min, najve 6000 rpm), odstranili supernatant in celice sprali s sterilno MQ.

Glede na vrsto seva sta sledili dve varianti:

-Avksotrofni ozna evalci: ustrezen delefl celic (transformacija s plazmidom: okoli 10 %) smo razmazali na ustrezno selekcijsko goji- e.

-Antibiotske determinante: celicam smo dodali 1 ml goji- a YPD, inkubirali 2 uri na 30 °C (brez stesanja), nato pa smo celice sprali s sterilno MQ in vse celice razmazali na ustrezno selekcijsko goji- e.

3.2.5.9 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic

Kompetentne bakterijske celice (DH5), ki smo jih hranili v alikvotih po 50 μ l pri -80 °C, smo odmrznili na ledu, jim dodali 5 ng transformirajo e DNA in nefno preme-ali. Po 30-minutni inkubaciji na ledu smo mikrocentrifugirke postavili za 30 s v vodno kopel s temperaturo 42 °C in s tem izvedli toplotni -ok, ki omogo i bolj-i vnos DNA v kompetentne celice. Sledila je inkubacija na ledu za 2 min, nato pa smo celicam dodali 250 μ l teko ega goji- a LB, segretega na 37 °C. Mikrocentrifugirke smo 1 h stresali (37 °C, 225 rpm). Po kon ani inkubaciji smo na plo- e s trdnim goji- em LBA razmazali po 100 μ l suspenzij transformirajo ih bakterijskih celic. Plo- e smo inkubirali ez no pri 37 °C in

naslednje jutro pre-teli kolonije. Izbrano -tevilno kolonij smo nato sterilno precepili v epruvete s 5 ml teko ega goji- a LBA in stresali preko no i (37 °C, 225 rpm) ter jih tako namnofili za nadaljnje postopke.

3.2.5.10 Preverjanje nukleotidnega zaporedja

Po tem, ko smo z restrikcijsko analizo potrdili, da smo v vektor (pCAU) uspe-no vstavili fragment DNA (gen *TST*), smo za potrditev kloniranja konstrukt do lo ili nukleotidno zaporedje. Nukleotidno zaporedje plazmida pCAU-*TST* so za nas preverili pri Eurofins MWG (Eurofins MWG Operon's DNA sequencing service).

Vzorci za po-iljanje smo pripravili v dveh mikrocentrifugirkah. V prvi je bilo 15 μ l plazmida (50-100 ng/ μ l) in 2 μ l F za etnega oligonukleotida (10 μ M), v drugi pa 15 μ l plazmida (50-100 ng/ μ l) in 2 μ l R za etnega oligonukleotida (10 μ M).

3.2.5.11 Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami

Za restrikcijo plazmidne DNA ali fragmentov DNA, pomnoflenih s PCR, smo uporabljali restrikcijske endonukleaze (Pregl. 7), ki prepoznajo to no do lo eno zaporedje dvooverifne DNA, hidrolizirajo fosfodiestersko vez in tako ustvarijo lepljive konce. Restriktaze smo izbirali glede na restrikcijska mesta v pomnoflku PCR ali v plazmidu in glede na lokacijo fragmentov DNA, ki so nas zanimali. Reakcijska me-anica za restrikcijo je vsebovala 500 ng matri ne DNA, 2 μ l pufra Fast Digest, 1 μ l encima Fast Digest in do 20 μ l MQ. Inkubacijo in inaktivacijo za razli ne encime smo izvedli po navodilih proizvajalca.

Po restrikciji smo za preverbo uspe-nosti restrikcije, restrikcijsko me-anico takoj nanesli na agarozni gel, izvedli agarozno gelsko elektroforezo in dolfino fragmentov preverili pod UV lu jo. e pa smo restrikcijo izvedli z namenom za kasnej-o uporabo fragmentov DNA pri ligaciji, smo razrezane fragmente v reakcijski me-anici najprej o istili z uporabo komercialnega kompleta reagentov QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN). Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca.

3.2.5.12 Ligacija

Fragment DNA in plazmid, ki smo ju fleleli zdruffiti, smo rezali z enako kombinacijo restrikcijskih endonukleaz. Tako smo dobili fragmente s komplementarnimi lepljivimi konci.

Naredili smo -tiri razli ne ligacijske me-anice, ki so se razlikovale glede na razmerje med vektorjem in vklju kom (1:5, 1:10, 1:15 in 1:20). Ligacijska me-anica je vsebovala 1 μ l ligacijskega pufra, 5-10 ng DNA (vektor in vklju ek v razli nih razmerjih, z upo-tevanjem dolfine fragmenta in vektorja), 0,5 μ l ligaze T4 in 3,3 μ l MQ. Ligacijsko me-anico smo

inkubirali 30 min pri 23 °C, po tem pa smo ligazo inaktivirali z inkubacijo za 10 min na 65 °C. Ligacijsko me-anico smo po inaktivaciji transformirali v bakterijske celice.

3.2.5.13 Konstrukcija plazmida *in silico* z uporabo programa ApE

S pomo jo prosto dostopne programske opreme ApE smo izdelali mape konstruktov DNA in plazmidov, ki smo jih uporabili za na rtovanje restrikcije, ligacije in za etnih oligonukleotidov za reakcije PCR.

3.2.6 Priprava seva BY4741 *tum1Δ mfa1::GAL1pr-TST-NatMX* z metodami molekulskega kloniranja

Zapis za gen *TST* smo pomnožili s PCR z uporabo za etnih oligonukleotidov s -trle imi konci (TST_pRD53_F in TST_pRD53_R) in polimerazo Q5. Trle i konci so sluffili za homologno rekombinacijo *TST* za *GAL1pr* v vektorju pRD53. Velikost pomnožka PCR (*TST*) smo preverili z AGE, nato pa smo pomnožke pri akovane velikosti o istili iz gela z uporabo komercialnega kompleta reagentov QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Sledila je transformacija celic kvasnega seva BY4741, ki smo jo izvedli z *BamHI* rezanim plazmidom pRD53 in PCR pomnožkom. Masno razmerje med plazmidom in vklju kom v transformacijski me-anici je bilo 1:30. Za kontrolo samoligacije plazmida pRD53 smo izvedli transformacijo celic BY4741 z le odprtim plazmidom pRD53. Celice smo po transformaciji selekcionirali na goji- u YNB-ura. Potencialne transformante smo namnožili v teko em goji- u YNB-ura in iz njih izolirali plazmidno DNA. Uspe-nost vstavitve *TST* v pRD53 smo preverili z reakcijo PCR s polimerazo Q5 (za etna oligonukleotida 02_mTst.F in 02_mTst.R). Za kontrolo smo za enako reakcijo PCR uporabili -e genomsko DNA, izolirano iz potencialnih transformant.

Plazmidno DNA seva BY4741, za katerega smo potrdili, da vsebuje pRD53-*TST*, smo transformirali v bakterijske celice One Shot Top 10. Transformante smo namnožili v teko em goji- u LBA in iz njih z uporabo komercialnega kompleta reagentov QIAquick® Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) izolirali plazmidno DNA. Slednja DNA nam je sluffila kot matri na DNA za reakcijo PCR s polimerazo Q5 in za etnima oligonukleotidoma z zapisom za restrikcijski mesti za *SalI* in *HindIII* (K_GAL_L, K_GAL_R) na 5'. Uspe-nost reakcije PCR smo preverili z AGE, nato pa smo pomnožek *GAL1pr-TST* izolirali iz gela z uporabo komercialnega kompleta reagentov QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). V naslednjem koraku smo po navodilih proizvajalca izvedli restrikcijo plazmida pAG25 in pomnožka PCR z endonukleazama *SalI* in *HindIII*. Uspe-nost restrikcije pAG25 smo preverili z AGE. Ligacijo pAG25 in kasete *GAL1pr-TST* smo izvedli v bakterijskih celicah One Shot Top 10. Masno razmerje med insertom in vektorjem je bilo 5:1. Transformante, ki so zrastle na goji- u LBA smo namnožili in nato iz njih s pomo jo komercialnega kompleta reagentov QIAquick® Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) izolirali plazmidno DNA.

Slednjo smo razrezali z restrikcijsko endonukleazo *Sfi*I. Fragment, velik okoli 5500 bp, ki je nastal po restrikciji s *Sfi*I smo izrezali iz gela in ga o istili s komercialnim kompletom reagentov QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN). O i- ena DNA nam je sluffila kot matri na DNA za PCR, s katero smo fleleli pomnofiti celotno kaseto *GAL1pr-TST-NatMX* (I_GAL_L in I_GAL_R). Za etna oligonukleotida sta vsebovala -trle a konca za homologno rekombinacijo v lokus *MFA1* v sevu BY4741*tum1* Δ . Pomnofek PCR smo transformirali v BY4741*tum1* Δ . Potencialnim transformantam, ki so zrasle na goji- u YPD-clonNAT smo izolirali genomsko DNA. Slednja DNA je bila matri na DNA za dve kontrolni reakciji PCR (kombinacija PR_I_PRED_L in PR_I_PRED_L ter kombinacija PR_I_ZA_L in PR_I_ZA_R).

3.2.7 Priprava seva BY4741 *tum1* Δ ::*TST* z metodami molekulskega kloniranja

Najprej smo iz kasete *KanMX* (vir: IJS, Kvasni laboratorij) s pomo jo za etnih oligonukleotidov UP_KanMX_F in DN_KanMX_R in polimeraze Q5 pomnofili genski zapis za *KanMX*. Pomnofek nam je sluffil kot matri na DNA v reakciji PCR, s katero smo pomnofili *KanMX* z za etnima oligonukleotidoma (TST_A_F in TST_A_R). Slednja za etna oligonukleotida imata -trle e konce za homologno rekombinacijo v sev, ki ima v lokus *MFA1* vstavljeno kaseto *GalPr-TST-NatMX* (A PCR, polimeraza Q5[®] Hot Start High-Fidelity). Uspe-nost reakcije PCR smo preverili z AGE. Pri akovana velikost fragmenta je bila 1548 bp. Produkt PCR (*KanMX* z vise imi konci za rekombinacijo v *MFA1* lokus) smo izrezali iz gela, o istili s pomo jo komercialnega kompleta reagentov QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) ter transformirali v sev BY4741 *tum1* Δ *mfa*::*GAL1-10pr-TST-Nat*^R. Transformacijsko me-anico smo razmazali na goji- e YPD-G418-clonNAT. Iz transformant smo izolirali genomsko DNA in z za etnima oligonukleotidoma TST_B_F in TST_B_R in polimerazo Q5 izvedli B PCR, s katerim smo pomnofili kaseto *TST-KanMX* in hkrati dodali vise e konce za homologno rekombinacijo v sev BY4741 *tum1* Δ . Ustreznost velikosti produkta B PCR (2524 bp) smo preverili z AGE. Produkt B PCR smo nato s pomo jo komercialnega kompleta reagentov QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) izolirali iz gela in transformirali v sev BY4741 *tum1* Δ . Ustreznost transformant smo preverili s tremi kontrolnimi reakcijami PCR s polimerazo Taq (Nov_TUM1_k_F in Nov_TUM1_k_R, Nov_Tum1_k_F in j_KanMX_R, j_KanMX_F in Nov_TUM1_k_R). Sev, ki je imel vse tri produkte PCR pri akovanih dolffin, je bil sev BY4741 *tum1* Δ ::*TST-KanMX*.

Da bi se v sevu BY4741 *tum1* Δ ::*TST-KanMX* odstranili zapisa za odpornost proti antibiotiku G418 (*KanMX*), smo izvedli izrezovanje s pomo jo Cre rekombinaze. Najprej smo v goji- u LBA s -esturnim stresanjem (37 °C, 250 rpm) namnofili bakterijske celice s plazmidom, ki vsebuje rekombinazo Cre (DH5 -pSH47). Zapis za rekombinazo Cre se nahaja za inducibilnim galaktoznim promotorjem in sluffi za prepoznavanje restrikcijskih

(lox) mest ter izrezovanje zapisa *KanMX*. Po navodilih proizvajalca smo z uporabo komercialnega kompleta reagentov QIAquick[®] Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) iz bakterijskih celic izolirali plazmid pSH47. Plazmid smo transformirali v sev BY4741 *tum1Δ-TST-KanMX* in kvasne celice razmazali na goji- e YNB-ura. Od transformant, ki so zrasle, smo izbrali dve koloniji, ju inokulirali v goji- u YP-Gal in jih 24 h stresali na 30 °C. Po inkubaciji smo obe kulturi razredili na OD₆₀₀=1 (10⁷ kvasnih celic). Na plo- o YPD smo razmazali 100 μl razred ene kulture kvasovk, v kateri je bilo okoli 100 kvasnih celic. Kolonije, ki so zrasle na goji- u YPD, smo nato preko sterilnega flameta ob sterilnih pogojih odtisnili na 2 goji- i: YPD-G418 in YNB-ura. Glede na rast na treh goji- ih smo iskali celice, ki so ostale brez rezistence proti antibiotiku G418 v genomu in niso imele plazmida pSH47. Celice ustreznega fenotipa smo -e dodatno preverili in jih -e enkrat razmazali na vsa tri goji- a (YPD, YNB-ura in YPD-G418). Iz ustreznih kvasnih celic (BY4741 *tum1Δ-TST*) smo izolirali genomsko DNA in uspe- nost izrezovanja zapisa za odpornost proti antibiotiku G418 potrdili s kontrolno veriflno reakcijo s polimerazo Taq (za etna oligonukleotida Nov_Tum1_K_F in Nov_Tum1_K_R) in AGE.

3.2.8 Priprava plazmida pCAU-TST z metodami molekularnega kloniranja

Iz matri ne DNA (vir: prof. dr. Simon Horvat, KI) smo z za etnima oligonukleotidoma 02_mTst.F in 02_mTst.R in polimerazo Q5 pomnožili gen *TST*. Pomnožek PCR smo uporabili kot matri no DNA pri reakciji PCR z za etnima nukleotidoma 01_mTst.F in 01_mTst.R, ki imata -trle a konca za homologno rekombinacijo v plazmid pCAU. V seva BY4741 in BY4741 *tum1Δ* smo transformirali odprt pCAU in produkt slednje reakcije PCR v razmerju 1:30 (razmerje mas). Seva BY4741+pCAU-*ADH1pr-TST* in BY4741 *tum1Δ*+pCAU-*ADH1pr-TST* smo pridobili po selekciji na plo- ah YNB-ura. Iz transformant smo izolirali plazmidno DNA in jo transformirali v bakterije (DH5). Bakterije smo namnožili (37 °C, 250 rpm, preko no i) in z uporabo komercialnega kompleta reagentov QIAquick[®] Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) iz njih izolirali plazmidno DNA. Prisotnost vklju ka *TST* v plazmidu pCAU smo potrdili z restrikcijo z encimoma *XbaI* in *XhoI*.

3.2.9 Dolo anje vsebnosti lipidov v celicah kvasovke

3.2.9.1 Nile red metoda

Prekono ne kulture preiskovanih sevov (6 ponovitev za vsak sev) smo pripravili v 200 μl posebnega minimalnega goji- a (Pregl. 14) na mikrotitrni plo- ici. Inkubacija je potekala 24 h na 30 °C brez stresanja. Po inkubaciji smo v 180 μl sveflega minimalnega goji- a prenesli 20 μl prekono ne kulture in preme- ali. Mikrotitrno plo- o smo prekrili z membrano ter inkubirali 72 h na 30 °C brez stresanja.

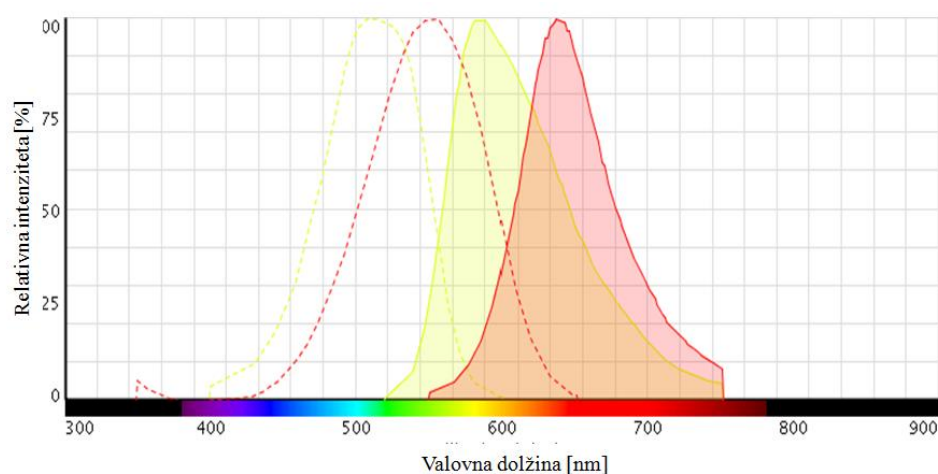
Po inkubaciji smo vzorcem izmerili OD₅₉₅ in fluorescenco ozadja. Za ponovljivost rezultatov smo morali zagotoviti, da je bila vrednost OD med 0,35 in 0,65. V primeru previsokega OD smo zato kulturo primerno redili. Nato smo v vsak prostor ek v rni mikrotitrni plo- i s prozornimi jamicami, kjer je fle bilo 200 µl kulture dodali -e 10 µl v DMSO raztopljenega barvila Nile red (kon na koncentracija 0,105 mg/ml) ter preme-ali. Inkubirali smo 25 min, 2 min pred koncem inkubacije pa -e enkrat preme-ali. Izmerili smo OD₅₉₅ in fluorescenco. Po vzbujanju z dvema razli nima valovnima dolffinama smo izmerili emisijo pri treh valovnih dolffinah (Pregl. 21).

Vsebnost lipidov smo izra unali s pomo jo spodnje ena be.

$$\frac{(\text{OD}_{595})}{(\text{OD}_{595} + \text{OD}_{620} + \text{OD}_{640})} \quad (1)$$

Preglednica 21: Vzbujanje in emisija pri metodi Nile red.

vzbujevalna svetloba (nm)	emisija (nm)
488	560
488	620
510	585



Slika 9: Spektralne lastnosti barvila Nile red v prisotnosti triacilgliceridov in fosfolipidov. Prikazana je relativna intenziteta pri dolo eni valovni dolfini. Rumena rtkana rta ozna uje ekscitacijo Nile red v okolju, bogatim s TG, rde a rtkana rta pa ekscitacijo v okolju, bogatim s FL. Rumena polna graf prikazuje emisijo za TG, rde polna graf emisijo za FL.

3.2.9.2 Dolo anje vsebnost lipidov s tankoplastno kromatografijo

Tankoplastno kromatografijo (ang. »thin layer chromatography«, TLC) so za nas izvedli na Univerzi v Gradcu v laboratoriju prof. dr. Klause Natterja.

3.2.10 Delo s tRNA

3.2.10.1 Izolacija tRNA iz kvasovk

Za inhibicijo in odstranjevanje RNaz s povr-in smo uporabili komercialni reagent RNaseZap[®] (Thermo Fisher Scientific). Opremo (mikrocentrifugirke, falkonke) smo suho sterilizirali 3 h pri 180 °C. Delo je potekalo v laminariju.

RNA oziroma tRNA smo iz kvasnih celic izolirali po protokolu raziskovalcev iz laboratorija DeRisi (Llinas, 2001) z nekaj spremembami, ki so opisane.

Vzgojili smo prekono no kulturo seva, iz katerega smo feleli izolirati molekule tRNA. Naslednji dan smo prekono no kulturo razred ili na OD₆₀₀=0,1 (100 ml) in stresali (30 °C, 250 rpm) do OD₆₀₀=0,5. Goji- e s kvasnimi celicami smo centrifugirali (4 °C, 5000 rpm, 5 min), zavrgli supernatant in celice resuspendirali v 12 ml pufru AEMgCl₂ (Pregl. 3). Ponovno smo centrifugirali (4 °C, 5000 rpm, 5 min), odstranili supernatant in celice resuspendirali v 12 ml pufra AEMgCl₂. Po naslednjem centrifugiranju (4 °C, 5000 rpm, 5 min) smo odstranili supernatant in celice resuspendirali v njihovem stokratnem volumnu pufra AEMgCl₂ in jih prenesli v sterilne falkonke, ki ne vsebujejo RNaz (suho steriliziranje). Dodali smo kisli fenol (pH=4,3) v razmerju 1:1 (celice v pufru:fenol). Da so celice nepopolno lizirale, smo falkonke stresali na stresalniku (40 rpm, 30 min). Po stresanju smo izvedli centrifugiranje (4 °C, 12000 rpm, 20 min) nato pa prenesli zgornji del supernatanta (vodna faza) v isto in sterilno falkonko brez RNaz. Dodali smo tak-en volumen 3 M natrijevega acetata (pH=5,2-5,6), da je bila kon na koncentracija 0,3 M. Sledila je precipitacija tRNA (preko no i pri 4 °C) v etanolu (kon na koncentracija etanola 70%). Naslednji dan smo izvedli centrifugiranje (4 °C, 12000 rpm, 45 min), odstranili supernatant, pelet resuspendirali v pufru AEMgCl₂ (najve 600 µl) in vse prenesli v isto mikrocentrifugirko brez RNaz. Dodali smo tak-en volumen 12 M LiCl, da je bila kon na koncentracija LiCl 2 M in inkubirali 1 h na ledu. S tem postopkom smo oborili dolge RNA molekule. Po enourni inkubaciji na ledu smo izvedli centrifugiranje (4 °C, najvi-ji obrati, 20 min) in supernatant s kratkimi molekulami RNA prenesli v sveflo mikrocentrifugirko brez RNaz. Kakovost izolirane RNA smo preverili z AGE. Pomembno je bilo, da so bili pufri in reagenti svefle pripravljene in brez RNaz. e vzorec RNA na gelu ni bil ist, smo -e enkrat dodali 12 M LiCl (kon na koncentracija 2M), inkubirali eno uro na ledu, centrifugirali (4 °C, najvi-ji obrati, 20 min) in supernatant prenesli v sveflo mikrocentrifugirko brez RNaz. Potem smo vsebini v mikrocentrifugirki dodali tak-en volumen 3 M natrijevega acetata (pH=5,2-5,5), da je bila kon na koncentracija 0,3 M. Molekule tRNA smo (4 °C, preko no i) precipitirali z 2,5-kratnim volumnom absolutnega etanola (kon na koncentracija 70 %). Naslednji dan smo centrifugirali (4 °C, najvi-ji obrati, 45 min), odstranili supernatant, pelet dvakrat sprali z 1 ml hladnega 70 % etanola ter nato ponovno centrifugirali (4 °C, najvi-ji obrati, 45 min) in po centrifugiranju

odstranili etanol ter pelet posu-ili. Pozorni smo bili na to, da se pelet ni posu-il. Po su-enju smo pelet resuspendirali v 50 μ l formamida. Z uporabo spektrofotometra NanoDrop smo izmerili koncentracijo tRNA. Kakovost RNA smo preverili tudi zAGE. Pri izvedbi AGE smo uporabljali opremo in reagente, ki niso vsebovali RNaz. tRNA smo do nadaljnje uporabe shranili na -80 °C.

3.2.10.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajo ih pogojih v prisotnosti uree in akrilaminofenilffivosrebrovega klorida

Deanaturirajo o urea poliakrilamidno gelsko elektroforezo (urea-PAGE z APM, ang. »acryloylaminophenylmercuric chloride«) smo izvedli s pomo jo protokolov, ki jih opisujejo Rio in sod. (2010), Leidel in sod. (2009) ter Summer in sod. (2009). Izvedli smo kombinacijo treh protokolov, ki je opisana spodaj.

Vso opremo za elektroforezo (stojala in nosilce za gele, stekla, avtomatske pipete in pipeterje) smo pred uporabo splaknili z MQ in obrisali s komercialnim RNaznim inhibitorjem RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific). Poliakrilamidni gel smo name-ali v laminariju, ki ni vseboval RNaz.

Pripravili smo 12 % lo evalni poliakrilamidni gel z APM (kon na koncentracija APM je 10 μ g/ml) in 4 % nana-alni gel. Lo evalni gel APM smo zame-ali v isti falkonki brez RNaz iz kemikalij, ki so opisane v Preglednici 3. Kemikalije smo dobro preme-ali, falkonko postavili za 10 s v mikrovalovno pe ico in nato vsebino razdelili na dva dela (vsak 15 ml). V prvo falkonko (kontrolni gel brez APM) smo pred razlitjem dodali le 10 % APS (75 μ l) in TEMED (7,5 μ l), v drugo (APM gel) pa smo poleg slednjih dveh kemikalij dodali -e APM. Prav tako smo v isti falkonki brez RNaz pripravili nana-alni gel (Pregl. 3). Vsebino smo dobro preme-ali in pred razlitjem dodali 10 % APS (75 μ l) in TEMED (7,5 μ l), ki sta omogo ila polimerizacijo.

Po tem, ko smo vlili lo evalni gel, smo na vrh nakapljali MQ. Da je lo evalni gel polimeriziral, smo po akali 45 min. Nato smo s pomo jo filtrirnega papirja odstranili MQ in vlili nana-alni gel. Previdno smo namestili glavni ek. Med name-anjem smo bili pazljivi na zra ne mehur ke. Po 45 min smo odstranili glavni ke in gel uporabili za elektroforezo.

V posamezen flepek v gelu smo nanесли 3,6 μ l vzorca, razred enega s 3,6 μ l MQ in zme-anega s 7,2 μ l nana-alnega pufra. Nana-alni pufer (2x) smo pripravili iz kemikalij, ki so opisane v Preglednici 3. Pred nanosom na gel smo vzorec dali za 10 min na 65 °C. Urea-PAGE elektroforeza je potekala v 0,5x TBE puftru 20 min pri 20 mA in konstantni napetosti (170 V), potem pa -e 90 min pri 10 mA in 140 V.

Gel smo pregledali pod UV lu jo in ga poslikali.

3.2.11 Izolacija proteinov iz kvasovk in prenos western

3.2.11.1 Izolacija proteinov iz kvasovk

Proteine smo iz kvasovk izolirali po prirejenem protokol Kurata in sod. (2009). Prekono no kulturo smo red ili do $OD_{600}=0,1$ (kon ni volumen 20 ml) in inkubirali s stresanjem (30 °C, 250 rpm) do $0,5 < OD_{600} > 0,8$. Po kon ani inkubaciji smo izmerili OD_{600} kulture in vse seve izena ili po enotah (1 enota pomeni, da je $OD_{600}=1$). Pripravili smo dve seriji: 7,5 enot in 10 enot. Izra unane volumne celi nih kultur, ki so predstavljali 7,5 enot in 10 enot smo pripravili v falkonkah in te smo centrifugirali (4 °C, najvi-ji obrati, 5 min). Odstranili smo supernatant in celice sprali s polovi nim volumnom vode. Ko smo odstranili vso vodo, smo falkonke s peletom celic potopili v teko i du-ik in jih do uporabe shranili na -80 °C.

Pelet celic smo odmrznili na ledu in ga resuspendirali v 500 µl svefle pripravljenega pufra za razbijanje celic (0,2 M NaOH in 0,2 % -merkaptoetanol). Celice v pufu smo inkubirali 10 min na ledu. Po inkubaciji smo proteine precipitirali v 5 % trikloro-ocetni kislini. Ponovno smo izvedli desetminutno inkubacijo na ledu, potem pa ekstrakte centrifugirali (4 °C, najvi-ji obrati, 5 min). Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, pelet sprali z MQ in ga nato resuspendirali v 100 µl svefle pripravljenega 1x nana-alnega pufra SDS (Pregl. 3). Pred nanosom na gel smo vzorce za 10 min inkubirali na 85 °C. Na gel smo nana-ali 3 razli ne koncentracije proteinov: 10 µl, 15 µl ali 20 µl vzorca smo dodali 1x nana-alni pufer SDS do kon nega volumna 30 µl. Na gel smo nato nanegli 15 µl me-anice.

3.2.11.2 Dolo anje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo dolo ili z uporabo komercialnega kompleta reagenotov Pierce® 660nm Protein Assay (Thermo Scientific). Sledili smo navodilom proizvajalca. Za vsak vzorec proteinov smo izvedli tri red itve (10x, 50x, 100x), za vsako red itev pa tri ponovitve.

3.2.11.3 NaDS-poliakrilamidna elektroforeza (NaDS-PAGE)

Za NaDS-PAGE smo pripravili 12,5 % lo evalni gel in 4 % nana-alni gel. Za 15 ml 12,5 % lo evalnega gela smo zame-ali: 4,688 ml 40 % poliakrilamida, 6,338 ml MQ, 3,75 ml 1,5 M Tris (pH=8,8) in 150 µl 10 % SDS, tik pred ulitjem pa smo dodali -e 10 % APS (75 µl) in TEMED (7,5 µl). Za 5 ml 4 % nana-alnega gela smo zame-ali: 500 µl 40 % poliakrilamida, 3,175 ml MQ, 1,250 ml 0,5 M Trisa (pH=6,8) in 50 µl 10 % SDS, tik pred ulitjem pa smo dodali -e 10 % APS (25 µl) in TEMED (5 µl).

Uporabili smo stojala in nosilna stekla za gele debeline 0,75 mm. Po ulitju lo evalnega gela smo na vrh dolili MQ in po akali 45 min, da je gel polimeriziral. Pred ulitjem nana-alnega gela smo s pomo jo filtrirnega papirja odstranili vodo na povr-ini gela.

Nana-alni gel smo ulili do vrha roba stekla in namestili glavni ek z desetimi flepki. Po 45 min smo odstranili glavni ek in gel uporabili za elektroforezo.

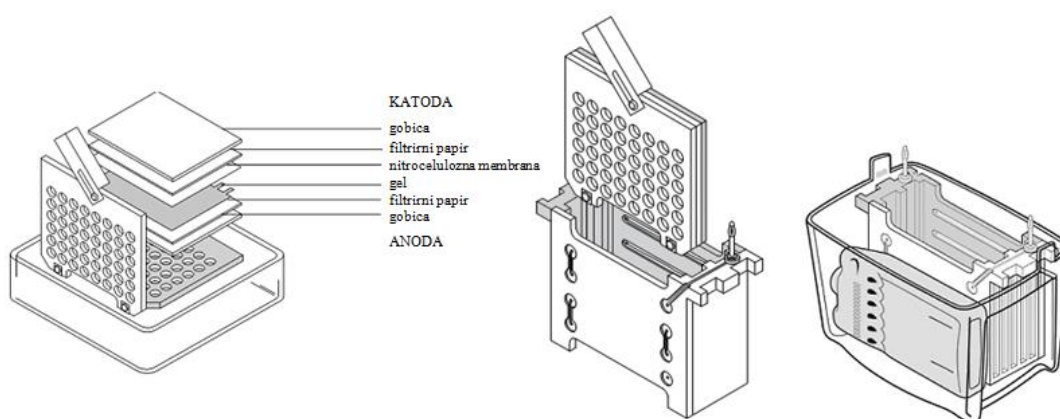
Elektroforeza z dvema geloma je potekala v 1x SDS pufu pri 30 mA in napetosti 300 V približno 1 h.

3.2.11.4 Barvanje proteinov s Coomassie modrim

Po kon ani elektroforezi smo s pomo jo plasti ne lopatke gel osamili, odstranili nana-alni gel in preostanek postavili v stekleno petrijevko z barvilom Coomassie modrim (raztopljene tablete Coomassie modro in 20 % ocetna kislina v razmerju 1:1). Gel smo barvali 1 h s stresanjem (40 rpm) nato pa smo ga premaknili v raztopino za razbarvanje (30 % etanol, 10 % ocetna kislina). Raztopino za razbarvanje smo menjali vsakih 30 min do primerne razbarvanja. Po potrebi smo razbarvanje izvajali s stresanjem preko no i. Po razbarvanju smo gel poslikali.

3.2.11.5 Prenos western

Po kon ani NaDS-PAGE elektroforezi smo gel osamili, odstranili nana-alni gel in preostanek gela po potrebi -e dodatno obrezali, nato pa za asno namestili v kadi ko s pufrom 1x Towbin Western. Sendvi za prenos western smo sestavili v plasti nem nosilcu iz 2 gobic, 2 filtrirnih papirjev, nitrocelulozne membrane in gela. Sendvi smo tesno zaprli in ga prenesli v nosilec z elektrodami, nato pa vse skupaj v kadi ko s pufrom Towbin Western (Sl. 9).



Slika 10: Sestava aparature za izvedbo prenosa western. Vir: Universidad de Guadalajara, 2012.

Prenos western je potekal 90 min pri 200 mA (konstantno) in 300 V v pufu 1x Towbin Western. Po kon anem prenosu smo sendvi razstavili in nitrocelulozno membrano s pomo jo pincete previdno prenesli v posodico z MQ, nato pa v 5 % blokirno raztopino (5 % mleko v prahu v pufu TBST). Membrano smo blokiral 1 h s stresanjem (40 rpm) v 5 %

blokirni raztopini. Po blokiranju smo iz plasti ne vre ke oblikovali manj-i flepek, v katerega smo previdno polofili membrano in jo prelili z 2 % blokirno raztopino s primarnimi protitelesi (primarna protitelesa smo red ili 1:1000). S pomo jo varilca za plastiko smo zatesnili vse stranice flepka. Membrano smo inkubirali preko no i s stresanjem (40 rpm) pri 4 °C. Naslednji dan smo nitrocelulozno membrano sprali s pufrom TBST (2-krat po 10 min s stresanjem pri 40 rpm na ST), nato pa jo inkubirali 1 h s stresanjem (40 rpm) v 5 % blokirni raztopini s sekundarnimi protitelesi (sekundarna protitelesa smo red ili 1:10000). Sledilo je spiranje v TBST (3-krat po 15 min s stresanjem pri 40 rpm na ST). Nitrocelulozno membrano smo do razvijanja hranili v raztopini TBS pri 4 °C.

Za razvijanje signala smo nitrocelulozno membrano prenesli v posodico, v kateri smo predhodno pripravili me-anico luminol/oja evalec in peroksid (razmerje 1:1) in ro no stresali 5 min. Nato smo nitrocelulozno membrano polofili v plasti no folijo in zajeli signal s pomo jo aparature za slikanje nitroceluloznih membran. as zajemanja slike je bil odvisen od jakosti signala. Prilagodili smo ga za vsak vzorec.

3.2.12 Svetlobna mikroskopija

Z mikroskopom Cell Observer (Zeiss) smo preverjali stanje kvasne kulture: velikost kvasnih celic, brstenje kvasnih celic, prisotnost bakterijske okuflbe. Vzorce za mikroskopiranje smo pripravili na dva na ina. V primeru, ko smo fleleli preveriti stanje prekono ne kulture, smo na objektno stekelce nanegli 5-10 µl prekono ne kulture in nato pokrili s krovnim stekelcem. Ko smo fleleli preveriti kvasno kolonijo iz plo- e, pa smo del kolonije prenesli v 5 µl MQ na objektnem stekelcu ter prekrili s krovnim stekelcem.

3.2.13 Statisti na obdelava podatkov

Za urejanje, statisti no obdelavo (povpre je, standardni odklon, statisti na zna ilnost) in grafi no predstavitev podatkov smo uporabili programsko opremo Microsoft Excel.

4 REZULTATI

4.1 MI-TMI PROTEIN Tst LAHKO SINTETIZIRAMO V KVASOVKI *Saccharomyces cerevisiae*

Z namenom potrditve sinteze in prisotnosti sesalskega proteina Tst v kvasovki *S. cerevisiae* smo iz -estih sevov kvasovke *S. cerevisiae* izolirali celokupne proteine. V prvi seriji smo delali z divjim tipom BY4741 in njegovima razli icama BY4741 *tum1* Δ in BY4741 *tum1* Δ ::*TST*. Pomembno je pударiti, da je bil v slednjem primeru mi-ji gen *TST* brez lastnega promotorja vstavljen v genom pod kontrolo nativnega promotorja kvasnega gena *TUM1*. V drugi seriji smo preverili proteinski profil sevov kvasovk, ki so vsebovali plazmid pCAU z mi-jim genom *TST* ali kvasnim genom *TUM1* pod uravnavo promotorja gena *ADHI*. To so sevi BY4741 *tum1* Δ [*ADHI*pr], BY4741 *tum1* Δ [*ADHI*pr-*TUM1*] in BY4741 *tum1* Δ [*ADHI*pr-*TST*]. Za negativni kontroli smo uporabili seva BY4741 *tum1* Δ [*ADHI*pr], to je sev s plazmidom brez vklju ka, in BY4741 *tum1* Δ [*ADHI*pr-*TUM1*]. Kot pozitivni kontroli smo uporabili mi-ja homogenata jeter in homogenat ma- evja. Mi-ja homogenata so za nas pripravili v laboratoriju prof. dr. Simona Horvata.

4.1.1 Detekcija proteina Tst s NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo in prenosom western

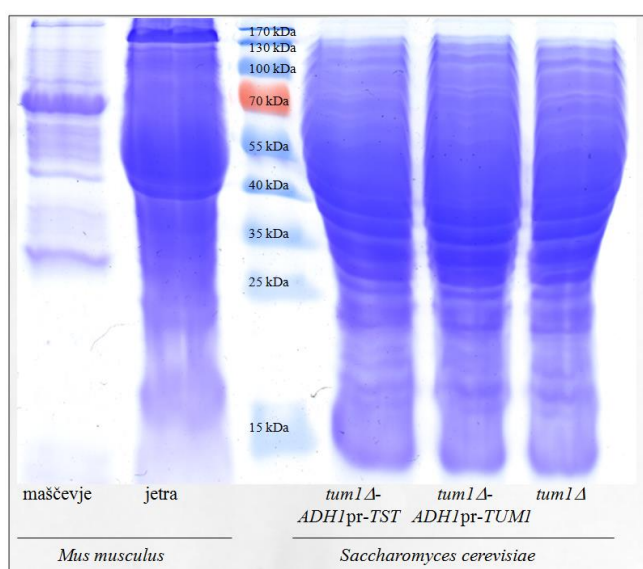
Za namene kasnej-e primerjave smo lo ili proteine z NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo, vsak vzorec na dveh gelih, na katerih so bile pozicije in koncentracije posameznih proteinskih vzorcev identi ne. Prvi gel smo pobarvali z barvilom Coomassie modrim, drugega pa smo uporabili za prenos western (Sl. 11 in Sl. 12).

Na NaDS-poliakrilamidnem gelu vidimo pet razli nih, po velikosti lo enih in s Coomassie modrim barvanih izolatov celokupnih proteinov iz mi-i in kvasovke (Sl. 11). Mi-ja vzorca proteinov smo na gel nanegli v dveh razli nih koncentracijah, kar se vidi tudi na fotografiji gela. Celokupna proteinska masa je bila manj-a pri proteinskem vzorcu iz ma- evja kot pri proteinskem vzorcu iz jeter. Rezultati tudi prikazujejo, da so bile kon ne mase nane-enih proteinskih izolatov iz treh razli nih sevov kvasovke *S. cerevisiae* primerljive.

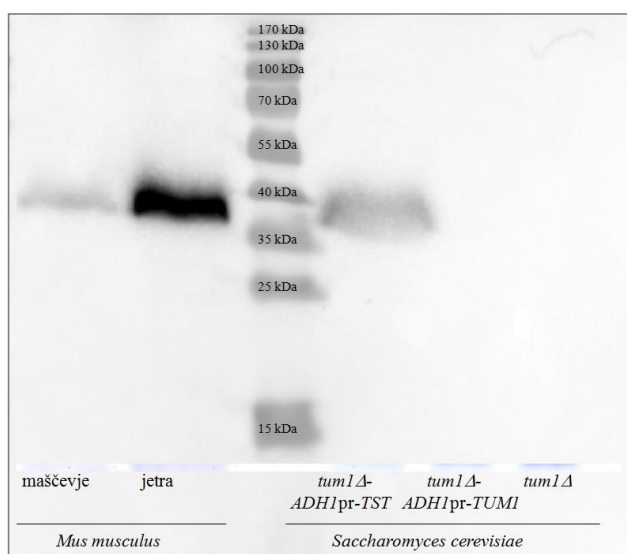
Prenos western smo izvedli s protitelesi proti sesalskemu proteinu Tst. Pri akovana velikost za detekcijo proteina Tst je 33 kDa. Na nitrocelulozni membrani pri obeh mi-jih vzorcih ter tudi pri proteinskem vzorcu iz seva BY4741 *tum1* Δ [*ADHI*pr-*TST*] kvasovke *S. cerevisiae* opazimo lise, ki predstavljajo proteine velikosti 38 kDa. Pri dveh mi-jih vzorcih, to sta vzorec iz ma- evja in vzorec iz jeter, vidimo na nitrocelulozni membrani dve razli no intenzivni lisi, ki sta v skladu s celokupno maso proteinov, nane-enih na gel.

Na nitrocelulozni membrani lo ene proteine iz seva BY4741 *tum1Δ::TST*, kjer je *TST* vstavljen za nativni promotor gena *TUM1*, ne opazimo lis, ki so primerljive s pozitivnima kontrolama (rezultati niso prikazani).

S prenosom western smo pokazali, da je mi-ji protein Tst prisoten v celicah kvasovke *S. cerevisiae* seva BY4741 *tum1Δ [ADH1pr-TST]*. Prisotnost istega proteina v sevu BY4741 *tum1Δ::TST* nismo zaznali.



Slika 11: Lo evanje mi-jih in kvasnih proteinov z NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Od leve proti desni si sledijo: proteinski homogenat iz ma- evja mi-i, proteinski homogenat iz mi-jih jeter, BY4741 *tum1Δ-ADH1pr-TST*, BY4741 *tum1Δ-ADH1pr-TUMI* in BY4741 *tum1Δ*.



Slika 12: Prenos western s primarnimi protitelesi proti mi-jemu proteinu Tst. Razporeditev na membrani je enaka kot na gelu NaDS-poliakrilamidne gelske elektroforeze (Sl. 11).

4.2 OLEAT NE INHIBIRA RASTI MUTANT V BIOKEMIJSKI POTI URM1

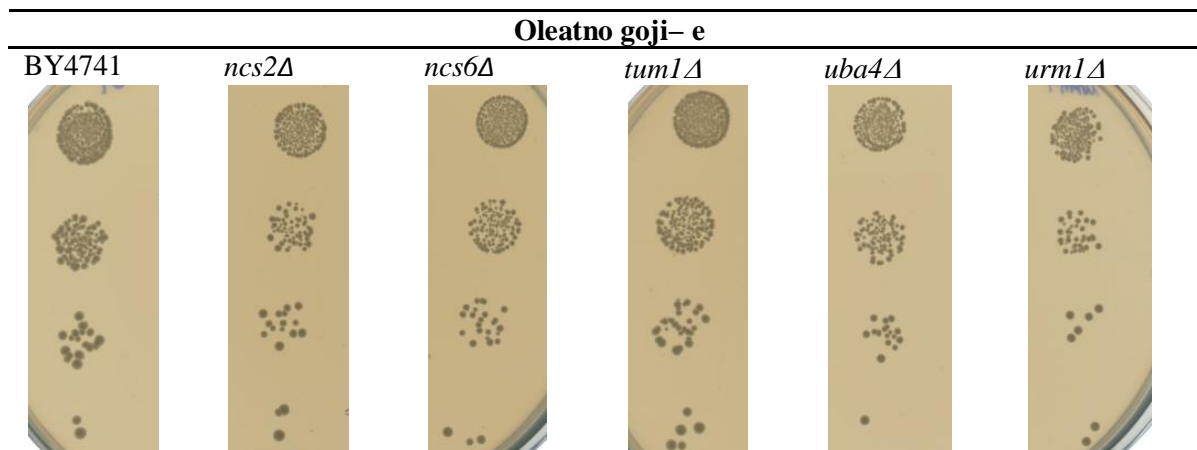
V nadaljevanju smo fleleli preveriti, ali geni, udelefleni v biokemijski poti URM1, sodelujejo pri metabolizmu lipidov kvasovke *S. cerevisiae*. Uporabili smo hitro in preprosto analizo, s katero preko uspe-nosti rasti sevov kvasovke na trdnem goji- u z oleatom oziroma oleatnim testom, lahko pokafemo, ali je dolo en gen udeleflen pri lipidnem metabolizmu kvasovke *S. cerevisiae*.

4.2.1 Oleatni test

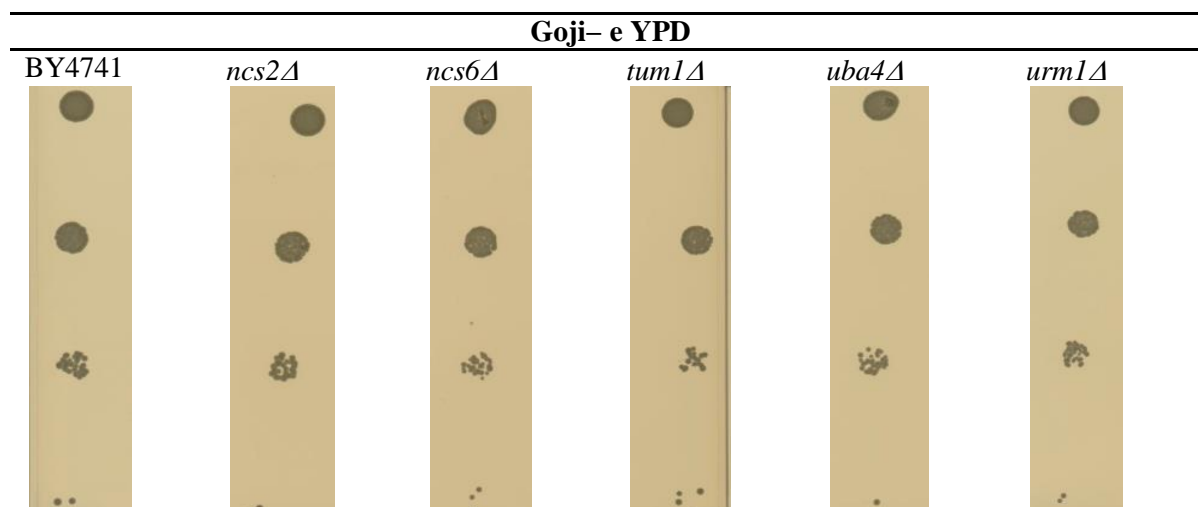
Oleatni test poteka na oleatnem goji- u (sestava opisana v poglavju »Goji- a«), kontrola rasti pa na goji- u YPD. Za analizo smo uporabili delecijejske seve genov, ki so udelefleni v biokemijski poti URM1, to so *NCS2*, *NCS6*, *URM1*, *UBA4* in *TUM1*.

Pri vseh sevih tako na oleatnem kot tudi na goji- u YPD je opaziti razli no gostoto kultur, kot posledica uporabljenih razli nih red itev kultur (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Najve jo red itev kulture smo nanесли na spodnji del agarne plo- e, najmanj red eno kulturo pa na zgornji del plo- e (Sl. 13-14).

Rezultati analize rasti na oleatnem goji- u kafejo, da je rast delecijejskih sevov *ncs2* Δ , *ncs6* Δ , *tum1* Δ , *uba4* Δ in *urm1* Δ na oleatnem goji- u in na goji- u YPD primerljiva rasti divjega tipa BY4741 (Sl. 13-14).



Slika 13: Oleatni test z mutantami v biokemijski poti URM1. Tiri red itve (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) si sledijo od najmanj red ene (zgoraj) do najbolj red ene (spodaj). Izogeni sev in njegove mutante so navedeni nad sliko.



Slika 14: Kontrola za oleatni test z mutantami v biokemijski poti URM1. Turi red itve (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) si sledijo od najmanj red ene (zgoraj) do najbolj red ene (spodaj). Izogeni sev in njegove mutante so navedeni nad sliko.

4.3 PROTEIN Tum1 VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

Da bi neposredno izmerili vpliv delecije ali prekomernga izraflanja dolo enega gena na vsebnost lipidov v kvasovki *S. cerevisiae*, smo izvedli metodo Nile red in analizo dolo enih vsebnosti lipidov s TLC. Z navedenima metodama smo izmerili vsebnost lipidov v eksponentni fazi rasti kvasovke *S. cerevisiae*.

4.3.1 Analiza Nile red

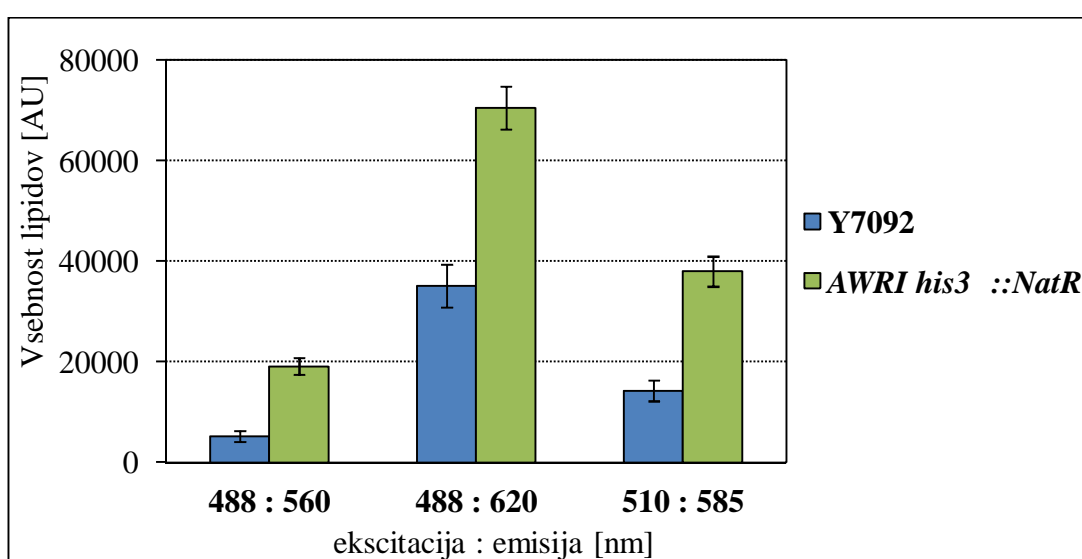
Z namenom testiranja metode Nile red, smo najprej preizkusili seva Y7092 in AWRI1631 *his3Δ::Nat^R*. To sta seva, za katera je bilo v na-em laboratoriju fle predhodno pokazano, da se zna ilno razlikujeta v vsebnosti lipidov.

Med sevoma Y7092 in AWRI1631 *his3Δ::Nat^R* kvasovke *S. cerevisiae* opazimo zna ilne razlike v vsebnosti lipidov (Sl. 15). Vsebnost lipidov (ekscitacija pri 488 nm, emisija pri 560 nm) je v sevu AWRI1631 *his3Δ::Nat^R* za 3,67-krat vi-ja kot v sevu Y7092. Vsebnost FL in TAG (ekscitacija pri 488 nm, emisija pri 620 nm) je pri AWRI1631 *his3Δ::Nat^R* 2,0-krat vi-ja kot pri sevu Y7092. Vsebnost TAG in del FL (ekscitacija prri 510 nm, emisija pri 585 nm) je pri AWRI1631 *his3Δ::Nat^R* za 2,67-krat vi-ja kot pri sevu Y7092.

Z metodo Nile red smo nato izmerili vsebnost lipidov v haploidnih in diploidnih sevih kvasovke *S. cerevisiae*, ki so prikazani v Pregl. 22.

Preglednica 22: Uporabljeni sevi za analizo vsebnosti lipidov z Nile red.

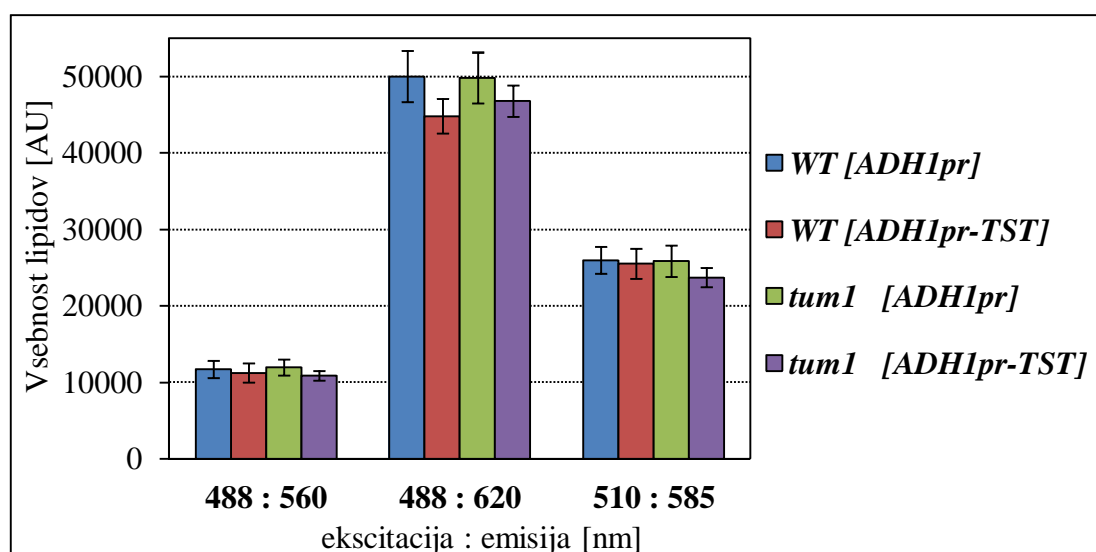
Haploidni sevi	Diploidni sevi
divji tip BY4741 [ADH1pr]	<i>TUM1/TUM1</i> [ADH1pr]
divji tip BY4741 [ADH1pr-TST]	<i>TUM1/TUM1</i> [ADH1pr-TUM1]
<i>tum1Δ</i> [ADH1pr]	<i>TUM1/TUM1</i> [ADH1pr-TST]
<i>tum1Δ</i> [ADH1pr-TST]	<i>TUM1/tum1</i> [ADH1pr]
	<i>TUM1/tum1</i> [ADH1pr-TUM1]
	<i>TUM1/tum1</i> [ADH1pr-TST]
	<i>tum1/tum1</i> [ADH1pr]
	<i>tum1/tum1</i> [ADH1pr-TUM1]
	<i>tum1/tum1</i> [ADH1pr-TST]



Slika 15: Kontrola metode z barvilom Nile red za analizo lipidov. Vsebnost lipidov je bila določena v sevih Y7092 in AWRI1613 *his3Δ::Nat^R*. Eksperiment je bil izveden v tirihi bioloških ponovitvah. Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

4.3.1.1 Analiza vsebnosti lipidov v haploidnih sevov

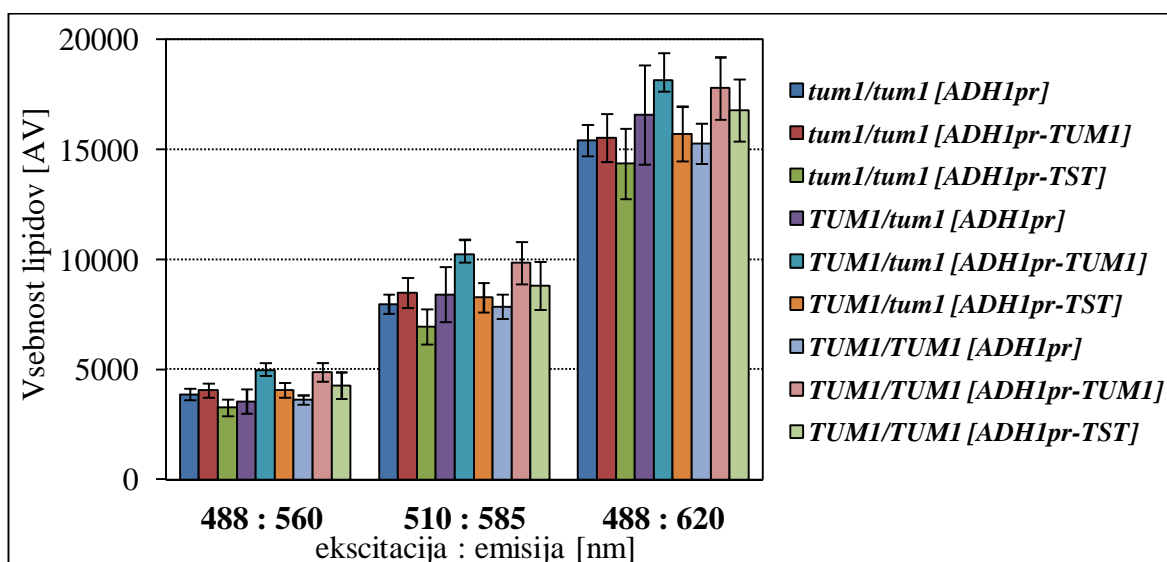
Po potrditvi ustreznosti metode Nile red za analizo lipidov v kvasovkah smo najprej testirali haploidne seve kvasovke *S. cerevisiae* (Pregl. 22). Med preverjanimi haploidnimi sevi kvasovke *S. cerevisiae* ne opazimo značilnih razlik v vsebnosti lipidov (Sl. 16).



Slika 16: Analiza vsebnosti lipidov haploidnih sevov kot dolo eno z analizo z barvilom Nile red. Seva vsebujeta plazmid pCAU z mi-jim genom *TST* pod uravnavo promotorja gena *ADH1*. Eksperment je bil izveden v -tirih biolo-kih ponovitvah. Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

4.3.1.2 Analiza vsebnosti lipidov v diploidnih sevih

Zanimalo nas je, ali lahko med diploidnimi sevi kvasovke *S. cerevisiae* zaznamo zna ilne razlike v vsebnosti lipidov, zato smo analizo Nile red izvedli tudi z diploidnimi sevi. Tudi med izbranimi diploidnimi sevi kvasovke *S. cerevisiae* ne opazimo zna ilnih razlik v vsebnosti lipidov (Sl. 17).



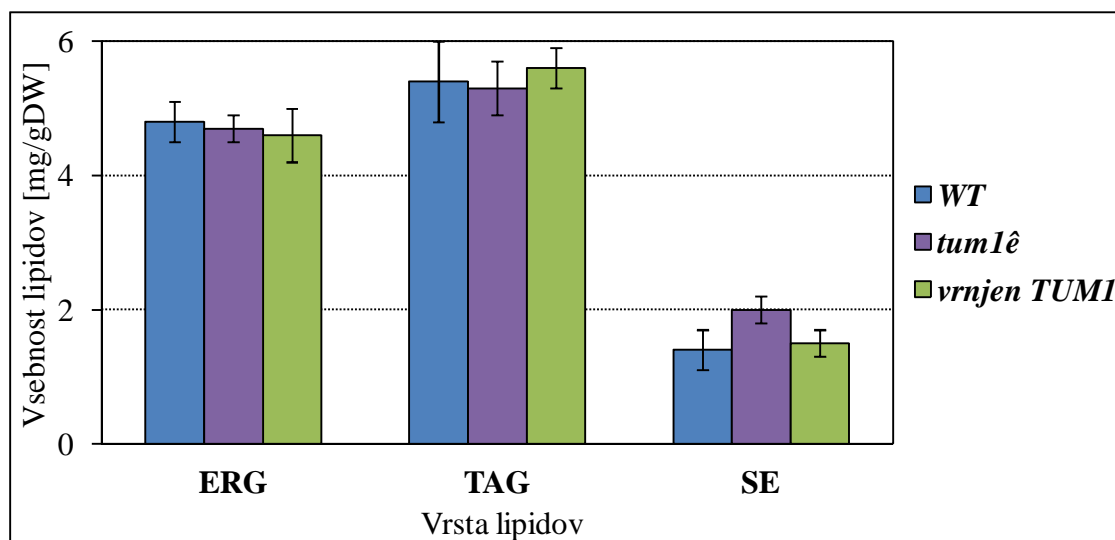
Slika 17: Nile red analiza vsebnosti lipidov v diploidnih sevih. Oznaka *tum1/tum1* pomeni delecijo obeh *TUM1*, *tum1/TUM1* predstavlja heterozigota in *TUM1/TUM1* divji tip. Eksperment je bil izveden v -tirih biolo-kih ponovitvah. Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

4.3.3 Raven izraflanja gena *TUM1* oziroma gena *TST* vpliva na vsebnost lipidov v kvasovki *S. cerevisiae*

Da bi dokon no potrdili ali ovrgli hipotezo, da protein Tum1 vpliva na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*, smo z metodo TLC detektirali nivo lipidov v celicah. To je metoda, ki je bolj natan na od metode Nile red in nam da podatke o vsebnosti treh vrst lipidov ó ergosterola (ERG), sterolnih estrov (SE) in triacilglicerolov (TAG). Metodo TLC so za nas izvedli v laboratoriju prof. dr. Klause Natterja na Univerzi v Gradcu.

4.3.3.1 Delecija gena *TUM1* vpliva na vsebnost sterolnih estrov v kvasovki *S. cerevisiae*

Z metodo TLC smo analizirali vsebnost lipidov pri divjem tipu BY4741 in podatke primerjali z vsebnostjo lipidov delecijskega seva BY4741 *tum1Δ*. Na sliki 18 je vidna zna ilna razlika v vsebnosti SE ob primerjavi divjega tipa BY4741 in delecijskega seva BY4741 *tum1Δ*. Vsebnost SE je v delecijem sevu BY4741 *tum1Δ* za 43 % vi-ja kot v divjem tipu BY4741. Na drugi strani, razlike v vsebnosti ERG in TAG med preiskovanima sevoma niso zna ilno razli ne. Sev, poimenovan »vrnjen *TUM1*«, smo uporabili z namenom potrditve, da je *TUM1* res tisti, ki vpliva na razlike v vsebnosti lipidov. Vstavitev gena *TUM1* v delecijski sev BY4741 *tum1Δ* na njegovo prvotno pozicijo, komplementacija seva, je vrnila lipidni fenotip na nivo divjega tipa BY4741.

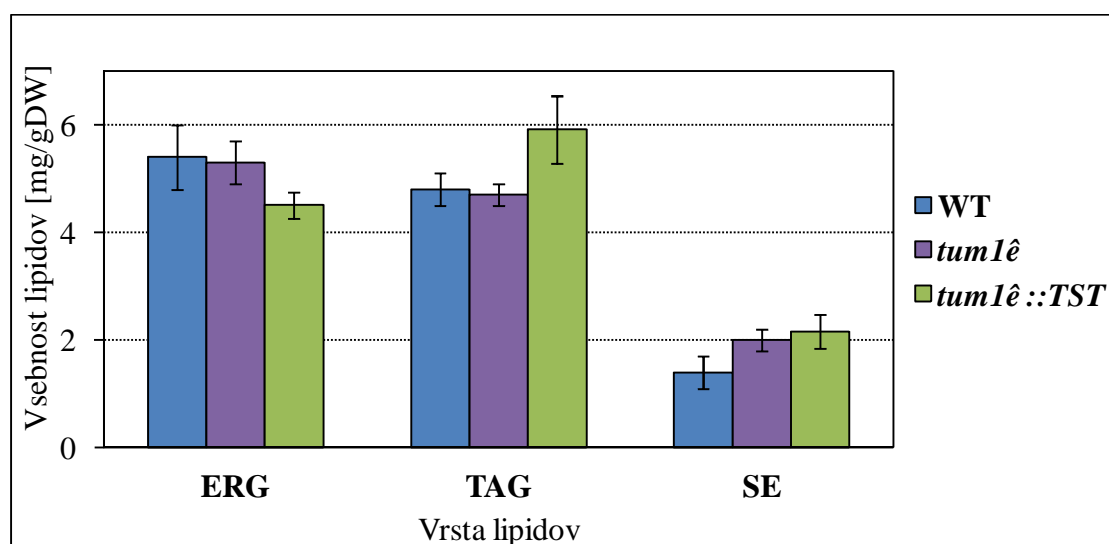


Slika 18: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, pri dvijem tipu BY4741 (WT), delecijem sevu BY4741 *tum1Δ* (*tum1Δ*) in v sevu BY4741 *tum1Δ*, v katerega je bil vrnjen gen *TUM1* (*tum1Δ::TST*). Vsebnost lipidov je prikazana kot delefl dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW). Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

4.3.3.2 Vpliv vstavitve mi-jega gena *TST* v genom kvasovke *S. cerevisiae* pod nativni promotor *TUM1pr* na lipidni metabolizem

Po tem, ko smo ugotovili, da je vsebnost SE v delecijem sevu BY4741 *tum1Δ* zna ilno ve ja kot v divjem tipu BY4741, nas je zanimalo, ali lahko z vstavitvijo mi-jega homolognega gena *TST* v delecijski sev BY4741 *tum1Δ* vrnemo vsebnost SE na nivo divjega tipa. Zapis za mi-ji gen za *TST*, ki smo ga pomnoffili iz cDNA, smo vstavili v genom kvasovke BY4741 *tum1Δ* pod kontrolo nativnega promotorja gena *TUM1*.

Na osnovi rezultatov ne moremo trditi, da je vsebnost SE razli na v sevu BY4741 *tum1Δ::TST* in delecijem sevu BY4741 *tum1Δ* (Sl. 19). Med tremi primerjanimi sevi ne opazimo zna ilnih razlik v vsebnosti ERG. Vsebnost TAG je pri sevu *tum1Δ::TST* zna ilno vi-ja kot pri drugih dveh primerjanih sevih, to sta divji tip BY4741 in delecijski sev BY4741 *tum1Δ*.

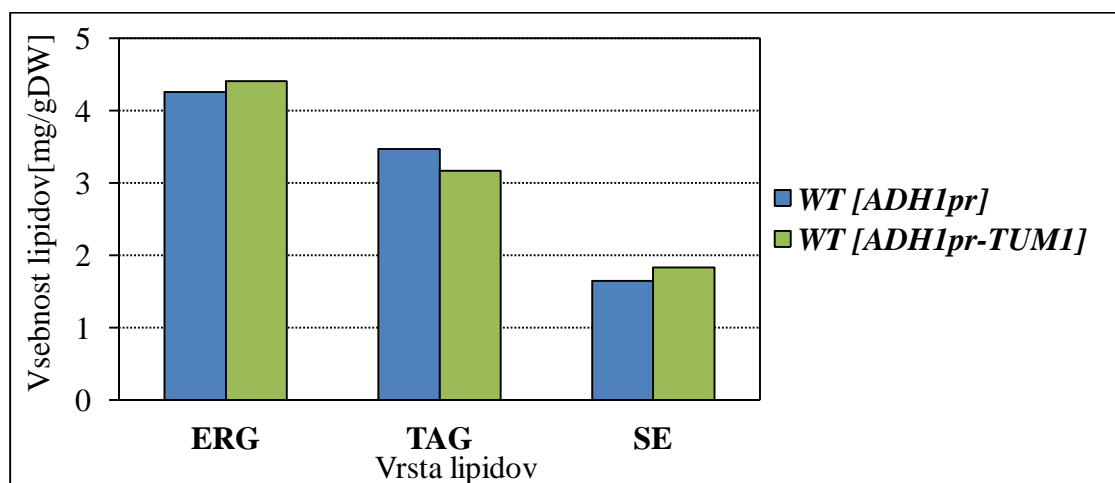


Slika 19: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, pri divjem tipu (WT), *TUM1* delecijem sevu (*tum1Δ*) in v *TUM1* delecijem sevu, v katerega je bil vstavljen *TST* (*tum1Δ::TST*). Vsebnost lipidov je prikazana kot delefl dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW). Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

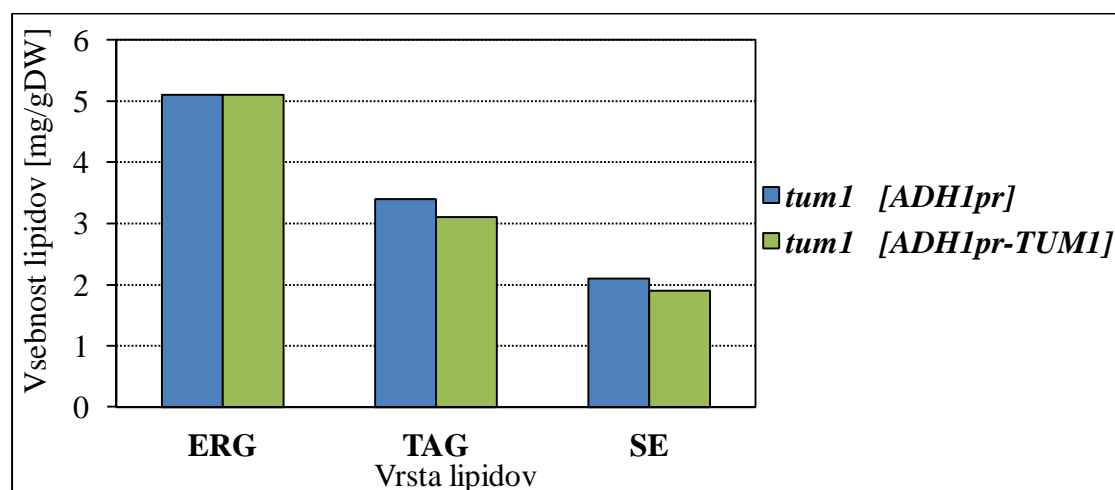
4.3.3.3 Vpliv izraflanja mi-jega gena *TST* oziroma kvasnega gena *TUM1* na plazmidu pod promotorjem *ADH1pr* na lipidni metabolizem

Naslednje analize vsebnosti lipidov s TLC smo izvedli, da bi primerjavi vpliv prekomerno izraflnega kvasnega gena *TUM1* in mi-jega gena *TST* na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*. Posamezni genski zapis smo vstavili v plazmid pCAU pod kontrolo mo nega promotorja gena *ADH1*, nato pa smo plazmidni konstrukt in izhodni plazmidni vektor transformirali v dva seva kvasovke ó divji tip BY4741 in delecijski sev BY4741 *tum1Δ*.

Pri sevih BY4741 in BY4741 *tum1* Δ s praznim plazmidom in plazmidom s *TUM1* pod promotorjem *ADH1pr* nismo izvedli biolo-kih ponovitev in zato rezultati niso prikazani s standardnimi odkloni (Sl. 20 in Sl. 21). Posledi no ne moremo govoriti o zna ilnih razlikah v vsebnosti lipidov med testiranimi sevi.



Slika 20: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 z genom *TUM1* pod uravnavo *ADH1pr* na plazmidu (WT [ADH1pr-TUM1]). [ADH1pr] ozna uje plazmid brez vklju ka [TUM1]. Vsebnost lipidov je prikazana kot delef dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW).

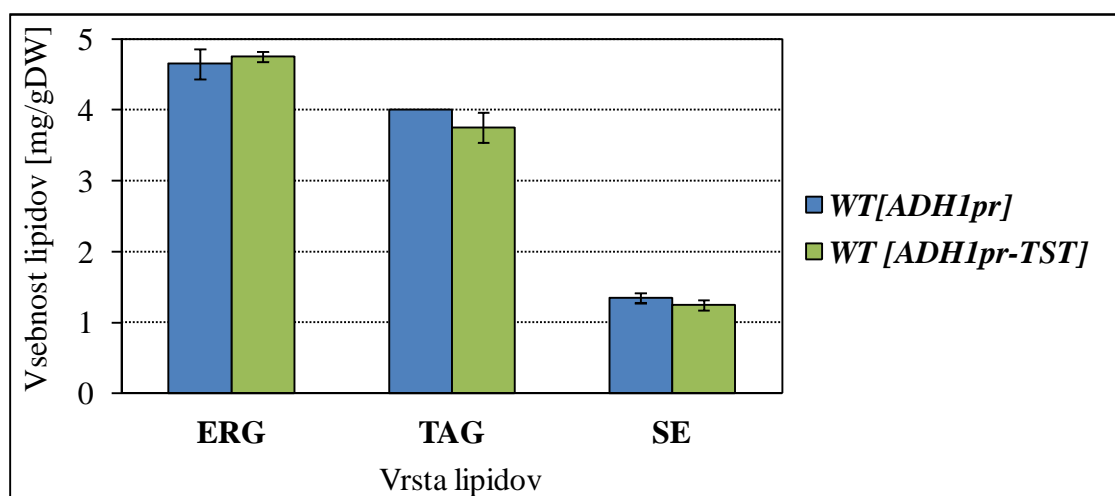


Slika 21: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v delecijem sevu BY4741 *tum1* Δ s komplementacijo *TUM1* pod kontrolo *ADH1pr* na plazmidu ([ADH1pr-TUM1]). [ADH1pr] ozna uje plazmid brez vklju ka [TUM1]. Vsebnost lipidov je prikazana kot delef dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW).

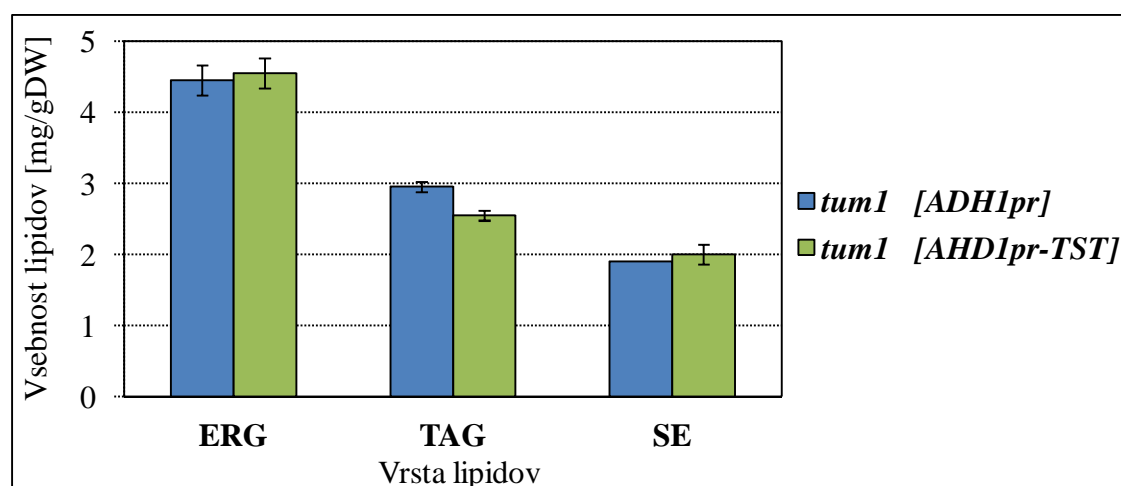
Pri seriji s *TST* na plazmidu pod promotorjem *ADH1* v divjem tipu BY4741 in delecijem sevu BY4741 *tum1* Δ in njihovih kontrolah smo imeli dovolj biolo-kih ponovitev, da smo

lahko izra unali standardne odklone in lahko zaklju imo o razlikah v metabolizmu lipidov med sevi.

Ko primerjamo vsebnost TAG med sevoma BY47471 *tum1* Δ [*ADH1pr*] in BY47471 *tum1* Δ [*ADH1pr-TST*] ter med BY4741 *tum1* Δ in BY4741 *tum1* Δ ::*TST* opazimo ravno obraten trend (Sl. 19 in Sl. 23). Med sevoma BY4741 *tum1* Δ in BY4741 *tum1* Δ ::*TST* opazimo trend vi-anja v vsebnosti TAG, medtem, ko med sevoma BY47471 *tum1* Δ [*ADH1pr*] in BY47471 *tum1* Δ [*ADH1pr-TST*] opazimo trend niflanja v vsebnosti TAG.



Slika 22: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 z genom *TUM1* pod uravnavo *ADH1pr* na plazmidu (WT [*ADH1pr-TST*]). [*ADH1pr*] ozna uje plazmid brez vklju ka [*TST*]. Vsebnost lipidov je prikazana kot delefi dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW). Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.



Slika 23: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v delecijem sevu BY4741 *tum1* Δ z genom *TST* pod uravnavo *ADH1pr* na plazmidu (*tum1* Δ [*ADH1pr-TST*]). [*ADH1pr*] ozna uje plazmid brez vklju ka [*TST*]. Vsebnost lipidov je prikazana kot delefi dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW). Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

4.4 PROTEIN Tum1 NE VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* PREKO TIOLACIJE tRNA

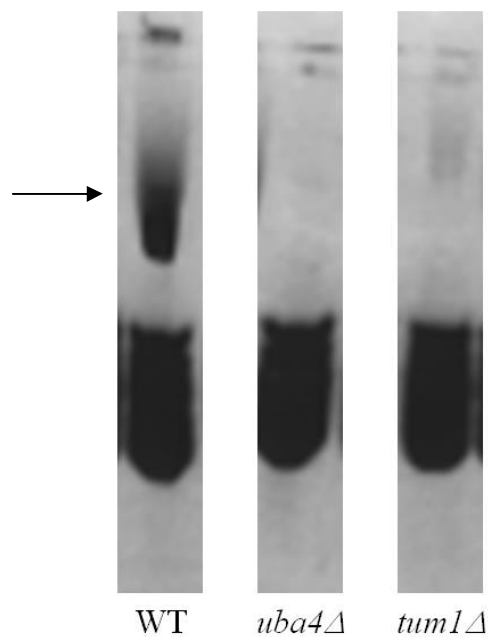
Ob ugotovitvi, da kvasni protein Tum1 sodeluje pri metabolizmu lipidov (Sl. 18-23), nas je zanimal mehanizem tega procesa.

4.4.1 Proteina Tum1 in Uba4 sta udeležena pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA

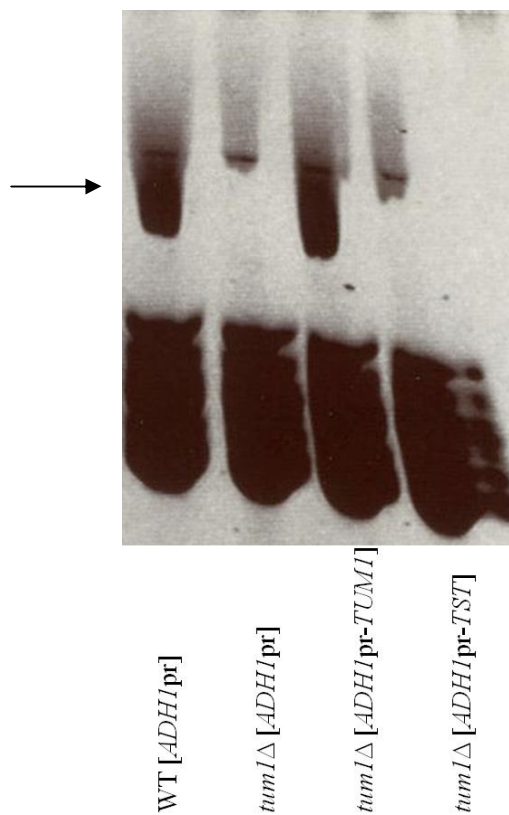
Edina do danes opisana biolo-ka vloga proteina Tum1 je pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA. Noma in Leidel s sodelavci (2009) so ugotovili, da v biokemijski poti URM1 za tiolacijo ohlapnega uridina molekule tRNA sodelujejo Nfs1, Uba4, Urm1, Tum1 ter Ncs2 in Ncs6. Zato smo najprej preverili raven tiolacije v divjem tipu BY4741 in dveh delecijjskih sevih BY4741 *uba4*Δ in BY4741 *tum1*Δ. Iz sevov smo izolirali tRNA in izvedli urea-poliakrilamidno elektroforezo z dodanim APM. Ta povzro i po asnej-e potovanje molekul tRNA, ki vsebujejo tiolno skupino, torej tudi uridine s tioliranim ohlapnim uridinom, ki nas zanimajo.

Na urea-poliakrilamidnem gelu z dodanim APM pri divjem tipu BY4741 opazimo liso (Sl. 24), ki predstavlja frakcijo tRNA, ki je tiolirana (ozna eno s pu- ico). Pri delecijjskem sevu BY4741 *uba4*Δ lise na enaki vi-ini kot pri divjem tipu ne opazimo. V delecijjskem sevu BY4741 *tum1*Δ je lisa, ki predstavlja frakcijo tioliranih tRNA, prisotna, vendar je manj intenzivna kot pri divjem tipu. To pomeni, da je tiolacija v delecijjskem sevu BY4741 *tum1*Δ zmanj-ana, kar je v skladu s predhodnimi rezultati, ki kafejejo, da v delecijjskem sevu BY4741 *tum1*Δ le 29 % molekul tRNA ostane tioliranih (Lu in sod., 2008; Huang in sod., 2008). Prisotnost produkta gena *TUM1* v biokemijski poti URM1 ni nujno potrebna, je pa pomembna za uspe-en nastanek 2-tiouridina. Torej lahko 2-tiolacija ohlapnega uridina delno pote e preko poti, v kateri ni prisoten protein Tum1 (Noma in sod., 2009).

Molekule tRNA smo izolirali tudi iz divjega tipa BY4741 in delecijjskega seva BY4741 *tum1*Δ, v katera smo transformirali plazmid pCAU z genom *TST* ali genom *TUM1* pod uravnavo promotorja *ADHI*pr. Na urea-poliakrilamidnem gelu z APM vidimo, da je lisa, ki predstavlja tiolirano tRNA, prisotna pri dveh sevih, to sta divji tip BY4741 [*ADHI*pr] in BY4741 *tum1*Δ [*ADHI*pr-*TUM1*]. Molekule tRNA iz sevov BY4741 *tum1*Δ [*ADHI*pr] in BY4741 *tum1*Δ [*ADHI*pr-*TST*] so delno tiolirane. Lisa, ki predstavlja frakcijo tiolirane tRNA, je v teh dveh sevih primerljiva (Sl. 25). Dokafemo, da mi-ji protein Tst ne more nadomestiti vloge Tum1 pri tiolaciji ohlapnega uridina molekul tRNA kvasovke *S. cerevisiae*.



Slika 24: Lo ba molekul tRNA sevov divjega tipa BY4741 (WT) in delecijskih sevov BY4741 *uba4*Δ in BY4741 *tum1*Δ na urea-poliakrilamidnem gelu z APM. Pu- ica ozna uje tiolirano frakcijo tRNA.

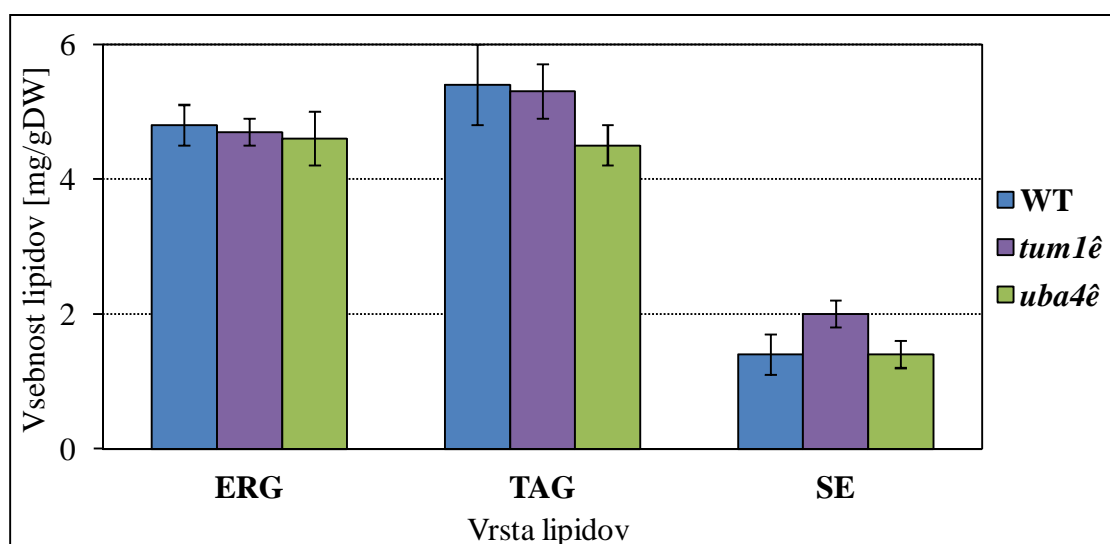


Slika 25: Lo ba molekul tRNA sevov divjega tipa BY4741 (WT [ADH1pr]) in delecijskih sevov BY4741 *tum1*Δ s plazmidom [ADH1pr], [ADH1pr-TUM1] ali [ADH1pr-TST] na urea-poliakrilamidnem gelu z APM. Pu- ica ozna uje tiolirano frakcijo tRNA.

4.4.2 Vsebnost lipidov v delecijem sevu *uba4Δ* je enaka kot v divjem tipu BY4741

Da bi dolo ili potencialni neposredni vpliv biokemijske poti URM1 oziroma proteina Uba4, ki deluje v omenjeni poti v kasnej-em koraku od Tum1, na lipidni metabolizem, smo izvedli dodatno analizo dolo enih vsebnosti lipidov z analizo s TLC.

Na grafu (Sl. 26) je predstavljena vsebnost treh vrst lipidov (ERG, TAG in SE) v treh sevih, to so divji tip BY4741, BY4741 *tum1Δ* in BY4741 *uba4Δ*. Vsebnost ERG in TAG se v analiziranih treh sevih zna ilno ne razlikuje. Smo pa s primerjanjem vsebnosti SE zaznali zna ilne razlike v vsebnosti pri sevu BY4741 *tum1Δ* v primerjavi z divjim tipom BY4741 ali delecijem sevom BY4741 *uba4Δ*. Raven SE v sevu BY4741 *uba4Δ* je enaka tisti v divjem tipu BY4741.



Slika 26: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 (WT) in delecijem sevih BY4741 *tum1Δ* ter BY4741 *uba4Δ*. Vsebnost lipidov je prikazana kot delefi dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW). Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

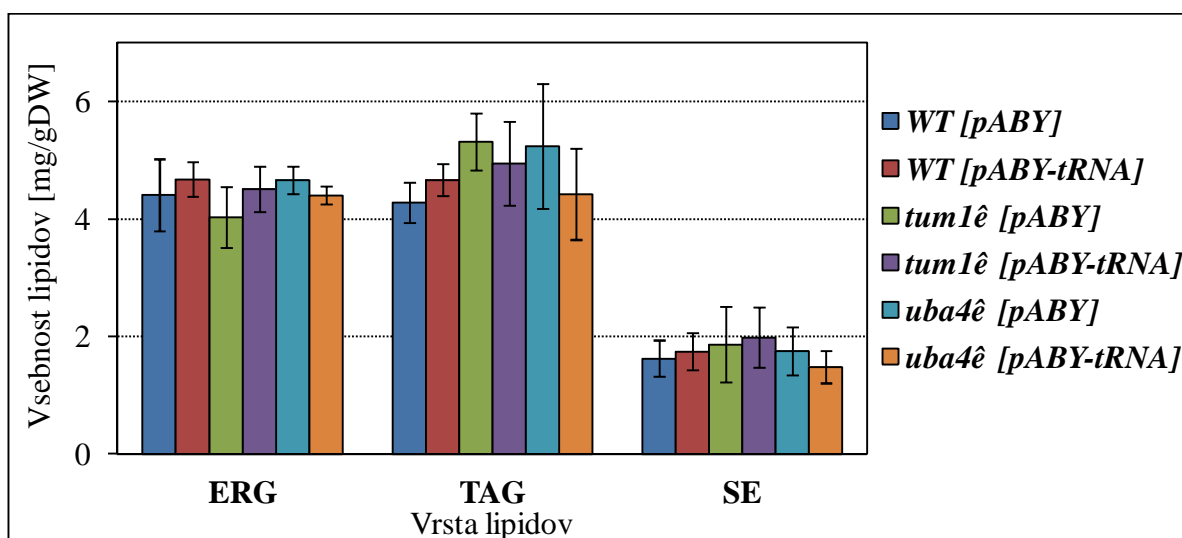
4.5 PREKOMERNO IZRAFIANJE TREH VRST tRNA (tQ^{UUG} , TK^{UUU} in tE^{UUC}) V DELECIJSKIH SEVIH *tum1Δ* in *uba4Δ* NE VRNE LIPIDNEGA FENOTIPA NA RAVEN DIVJEGA TIPA

Noma in sodelavci (2009) so pokazali, da prekomerno izraflanje treh specifi nih vrst molekul tRNA (tQ^{UUG} , TK^{UUU} in tE^{UUC}) v delecijem sevu BY4741 *uba4Δ*, delno supresira efekt delcije oziroma pomanjkanja tiolacije ohlapnega uridina molekule tRNA. Pokazali so tudi, da te tri vrste tRNA supresirajo slab-o rast delecijem sevov *ncs2Δ* in *ncs6Δ* na goji- u YPD z dodanim rapamicinom (2 nM).

Zanimalo nas je, ali lahko prekomerno izraflanje treh specifi nih vrst molekul tRNA (tQ^{UUG} , TK^{UUU} in tE^{UUC}) vrne lipidni fenotip seva BY4741 *tum1* Δ na raven divjega tipa. Hkrati smo feleli preveriti vpliv prekomernega izraflanja tRNA na sev BY47471 *uba4* Δ . Za preverjanje vsebnosti ERG, TAG in SE v sevih kvasovke *S. cerevisiae* smo zato izvedli analizo s TLC.

Rezultati analize kafejo, da med preiskovanimi sevi ni razlik v vsebnosti treh vrst lipidov, ERG, TAG in SE. To pa je v nasprotju s predhodnimi rezultati, kjer v delecijem sevu BY4741 *tum1* Δ opazimo zna ilno povi-anje vsebnosti SE glede na divji tip.

S tem eksperimentom ne moremo potrditi hipoteze, da je vpliv Tum1 na vsebnost SE povezana z njegovo vlogo v tiolacijo tRNA.



Slika 27: Vsebnost ERG, TAG in SE, dolo ena z metodo TLC, v divjem tipu BY4741 (WT) in delecijem sevih BY4741 *tum1* Δ ter BY4741 *uba4* Δ ob prekomernem izraflanju treh specifi nih vrst tRNA. Oznaka pABY525 ozna uje plazmid brez vklju ka za sineto tRNA (kontrola), oznaka pABY1653 pa plazmid z zapisom za tri vrste tRNA (tQ^{UUG} , TK^{UUU} in tE^{UUC}). Vsebnost lipidov je prikazana kot delefi dolo ene vrste lipidov (ERG, TAG ali SE) glede na suho maso kvasnih celic (gDW). Rezultati na sliki so prikazani s standardnimi odkloni.

5 RAZPRAVA

Produktom -tevilnih genov pripisujejo vlogo v metabolizmu lipidov, vendar nas novo odkriti geni vedno znova opozarjajo, da na-e poznavanje lipidnega metabolizmu -e ni celostno zaklju eno. Mi-ji protein Tst je bil opisan kot soudelefen pri metabolizmu lipidov (Horvat, neobjavljeno). S primerjavo aminokislinskega zaporedja mi-jega proteina Tst s proteini kvasovke *S. cerevisiae* smo odkrili kvasni protein Tum1. Do danes edina znana biolo-ka vloga kvasnega proteina Tum1 je, da sodeluje pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA oziroma pri biokemijski poti URM1 (Sl. 7) (Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009). Vpletenosti proteina Tum1 pri lipidnem metabolizmu, po na-ih podatkih, do danes teoreti no ali eksperimentalno ni dokazal -e nih e.

5.1 MI^{TMI} PROTEIN Tst LAHKO SINTETIZIRAMO V KVASOVKI *Saccharomyces cerevisiae*

Z metodo prenos western smo dokazali izraflanje mi-jega proteina Tst v kvasnem sevu BY4741 *tum1* Δ [*ADHIpr-TST*]. Pomembno je omeniti, da je gen *TST* v slednjem sevu prisoten na plazmidu pCAU in se izrafla pod kontolo mo nega promotorja *ADHIpr*. Plazmid vsebuje *CEN-ARS* regijo (ang. »autonomously replicating sequences« (ARS) in ang. »centomere« (CEN)), kar povzro i, da je v kvasni celici prisoten v nizkem -tevilu kopij (Shen in sod., 2012).

Molekulska masa mi-jega proteina Tst je 33466 Da (podatkovna zbirka UniProt). Mi-ja proteinska vzorca iz ma- evja in jeter, za katera je znano, da sintetizirata Tst, sta nam sluffila kot pozitivni kontroli (Sl. 12). Lisi smo na nitrocelulozni membrani po prenosu western opazili pri okoli 38 kDa. Po izolaciji proteinov iz kvasnega seva BY4741 *tum1* Δ [*ADHIpr-TST*] in po western prenosu smo lise na nitrocelulozni membrani opazili na enaki vi-ini. Ve jo proteinsko maso od pri akovane bi lahko razlofili z nekaterimi posttranslacijskimi modifikacijami proteina Tst.

Na drugi strani po prenosu western proteinskega vzorca iz kvasnega seva BY4741 *tum1* Δ ::*TST*, lis na pri akovani poziciji (primerjava s pozitivno kontrolo) po takoj-njem razvijanju signala nismo opazili (rezultati niso prikazani). Po 15 min razvijanja smo opazili mnogo nespecifi nih lis oziroma mo no ozadje, med drugim tudi na pri akovani vi-ini, to je pri 38 kDa. Vendar jakost signala med mi-jimi in kvasnimi proteinskimi vzorci ni bila primerljiva ó fle po minuti razvijanja je bila lisa iz proteinskih vzorcev pozitivne kontrole bolj temna kot lisa iz kvasnih vzocev po 15 min razvijanja. Nespecifi no ozadje po prenosu western pri kvasnem sevu BY4741 *tum1* Δ ::*TST* morda zakriva specifi no liso, ki predstavlja protein Tst. Koncentracija proteina Tst v kvasnem sevu BY4741 *tum1* Δ ::*TST* je zaradi -ibkega nativnega promotorja kvasnega gena *TUM1* o itno majhna. Predpostavljamo, da je protein Tst v sevu BY4741 *tum1* Δ ::*TST* prisoten, vendar je raven

izraflanja pod mejo detekcije z uporabljenimi protitelesi. Glede na rezultate obeh serij prenosa western predpostavljamo, da je koncentracija proteina Tst v sevu BY4741 *tum1Δ::TST* niifja od koncentracije proteina v sevu BY4741 *tum1Δ [ADH1pr-TST]*. Predpostavko podpira tudi podatek, da je promotor *ADH1pr* mo nej-i od nativnega promotorja kvasnega gena *TUM1* (Ghaemmaghami in sod., 2003).

Z metodo prenos western smo potrdili prisotnost oziroma sintezo proteina Tst v kvasovki *S. cerevisiae*. Z metodo smo dokazali, da je protein v kvasni celici prisoten v tak-ni obliki, da ga prepoznajo protitelesa proti Tst. Vendar z upo-tevanjem rezultatov ne moremo trditi, da je protein Tst v kvasovki *S. cerevisiae* funkcionalen. Ker nas zanima predvsem njegov vpliv na lipidni metabolizem, smo se v nadaljevanju osredoto ili na metode za posredno in neposredno opazovanje sprememb v lipidnem metabolizmu oziroma razlik v vsebnosti dolo enih vrst lipidov.

5.2 RAST SEVOV, UDELEfiENIH V BIOKEMIJSKI POTI URM1 KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*, JE ENAKA NA GOJI™ U YPD IN OLEATNEM GOJI™ U

Vplivi oleata na kvasne celice so razli ni. Oleat igra pomembno vlogo pri mnogih celi nih procesih, to so sinteza lipidov, nastanek membrane, za etek proliferacije peroksisomov, stimulacija biogeneze lipidnih kapelj in uravnavanje izraflanja genov (Wriessnegger in sod., 1993; Casey in sod., 1993; Saleem in sod., 2008; Binns in sod., 2006). Na drugi strani pa ima oleat negativen vpliv na preflivetje celic in povzro a takoimenovane lipotoksi ne efekte (Garbarino in sod., 2005). Celice kvasovke *S. cerevisiae* so ob utljive na oleat. Td posebno so ob utljive tiste, ki imajo napake v shranjevanju nevtralnih lipidov (Kohlwein in Petschnigg, 2007; Petschnigg in sod., 2009).

Pokazali smo, da je rast delecijjskih sevov *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *tum1Δ*, *uba4Δ* in *urm1Δ* na oleatnem goji- u primerljiva rasti divjega tipa BY4741 (Sl. 12, Sl. 13). Izbrali smo tiste delecijjske seve, ki imajo izbrisane gene, ki so bili opisani kot sodelujejo i v biokemijski poti URM1 (Sl. 7) (Huang in sod., 2008; Noma in sod., 2009, Leidel in sod., 2009).

Glede na te rezultate, ne moremo trditi, da delecija genov, udeleflenih v biokemijski poti URM1, vpliva na lipidni metabolizem. Vendar pa v splo-nem z uporabo te analize ne moremo delati dokon nih zaklju kov o vplivih delecije genov, udeleflenih v biokemijski poti URM1, na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*. Dodatna eksperimenta, ki bi pripomogla k natan nej-i analizi vpliva oleata na kvasne celice, sta elektronska mikroskopija in merjenje hitrosti rasti sevov kvasovke. Z raziskovanjem vpliva oleata na seve kvasovke *S. cerevisiae* nismo nadaljevali, ker smo za neposredno merjenje vpliva delecije ali prekomernega izraflanja *TUM1* in genov, udeleflenih v poti URM1, na vsebnost lipidov, imeli na razpolago bolj zanesljivo neposredno metodo TLC, to je analiza vsebnosti dolo enih lipidov v celici.

5.3 NIVO IZRAFIANJA KVASNEGA GENA *TUM1* OZIROMA MI-TJEGA GENA *TST* VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*.

Raziskovanje potencialne vpletenosti specifi nega genskega produkta pri metabolizmu lipidov se obi ajno za ne z natan nim kvantitativnim dolo anjem vsebnosti lipidov v delecijjskih sevih kvasovke *S. cerevisiae*, kjer je izbrisan preverjan genski zapis (Schneiter in Daum, 2006).

5.3.1 Metoda Nile red

Z metodo Nile red lahko neposredno izmerimo vsebnost lipidov v kvasovki *S. cerevisiae*. Metodo smo uporabili zato, ker lahko z njo v kratkem asu dolo imo vsebnost lipidov v velikem -tevilu sevov. Metode za kvantifikacijo lipidov, kot za primer teko inska kromatografija ali kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo, vklju ujejo korake od izolacije lipidov do njihove karakterizacije in so tako asovno zahtevne v primeru, ko felimo testirati ve je -tevilu kvasnih sevov (Rostron in sod., 2015).

Z izmerjenimi zna ilnimi razlikami v vsebnost lipidov med sevoma Y7092 in AWRI1631 *his3Δ::Nat^R* smo potrdili, da je metoda Nile red ponovljiva in zanesljiva kot pokazatelj dovolj velike razlike v vsebnosti lipidov (Sl. 16).

Najprej smo primerjali vsebnost lipidov med haploidnimi sevi kvasovke *S. cerevisiae*. V divji tip BY4741 in delecijjski sev BY4741 *tum1Δ* smo vstavili plazmid, na katerem se pod kontrolo mo nega promotorja gena *ADHI* izrafla mi-ji gen *TST*. Prisotnost proteina Tst v kvasni celici smo, kot fle opisano, predhodno dokazali s prenosom western (Sl. 12). Kot negativno kontrolo smo uporabili divji tip BY4741 in delcijjski sev BY4741 *tum1Δ* s praznim plazmidom (*[ADHIpr]*). Med -tirimi haploidnimi sevi kvasovke *S. cerevisiae* nismo opazili zna ilnih razlik v vsebnosti lipidov (Sl. 16). Tudi med izbranimi diploidnimi sevi kvasovke *S. cerevisiae* z metodo Nile red nismo zaznali zna ilnih razlik v vsebnosti lipidov (Sl. 17). Tokrat smo na plazmidu pod mo nim *ADHI* promotorjem izrazili tako kvasni gen *TUM1*, kot tudi mi-ji gen *TST*.

Metoda Nile red se je izkazala kot dovolj ob utljiva in zanesljiva v oleogenih sevih in pri genetsko spremenjenih sevih kvasovke *S. cerevisiae*, kjer so spremenjeni tisti geni, ki imajo velik vpliv na lipidni metabolizem. Taki geni so za primer tudi esencialni geni *DGA1*, *LRO1* in *FAT1*, udelefleni pri metabolizmu nevtralnih lipidov (ve v poglavju 2.4.4) (Rostron in sod., 2015). Vendar ima, kot vsaka metoda, tudi metoda Nile red svoje omejitve. V splo-nem zazna le nevtralne lipide. Zato moramo za nadaljnjo razlikovanje med posameznimi vrstami lipidov uporabiti -e druge metode. Druga omejitev se nana-a na ob utljivost. Rostrom in sod. (2015) so ugotovili, da metoda ni dovolj zanesljiva, da bi zaznala razlike v vsebnosti lipidov, ko so le-te majhne. Mi z metodo Nile red nismo zaznali

razlik v vsebnosti lipidov med preiskovanimi sevi, vendar je mogo e, da so le-te prisotne, a relativno majhne in zato pod mejo za detekcijo z barvilom Nile red. Na podlagi rezultatov, pridobljenih z metodo Nile red, zato ne moremo potrditi ali ovre i hipoteze, da sta kvasni gen *TUM1* in mi-ji gen *TST* udeleena v lipidnem metabolizmu kvasovke *S. cerevisiae*.

5.3.2 Z metodo TLC zaznamo razlike v vsebnosti lipidov med preiskovani sevi

Tako smo raziskovanje nadaljevali z metodo TLC, ki je bolj občutljiva metoda za tako kvalitativno kot tudi kvantitativno lo evanje in analizo lipidov (Nelson, 1975). Metodo TLC so za nas izvedli v laboratoriju prof. dr. Klause Natterja na Univerzi v Gradcu.

Metoda TLC je za kvasovke *S. cerevisiae* normalizirana glede na vsebnost ERG. Ta se nahaja v plazemski membrani, kjer uravnava njeno strukturo in permeabilnost (Kristan in Rifner, 2012). Vse kvasne celice za analizo TLC so bile enake velikosti, zato smo pri enaki masi kvasovk pri akovali primerljivo vsebnost ERG. Glede na to predpostavko smo izlo ili ponovitve, pri katerih je vsebnost ergosterola odstopala za ve kot 20 %.

5.3.2.1 Delecija *TUM1* vpliva na vsebnost sterolnih estrov v kvasovki *S. cerevisiae*

Najprej so nas zanimale razlike v vsebnosti lipidov med divjim tipom BY4741 in delecijским sevom BY4741 *tum1Δ*. V delecijским sevu BY4741 *tum1Δ* smo izmerili zna ilno vi-jo vsebnost SE kot pri divjem tipu BY4741 (Sl. 18). Vstavitev gena *TUM1* na njegovo prvotno pozicijo v delecijским sevu BY4741 *tum1Δ*, je vrnilo lipidni fenotip oziroma vsebnost SE na raven divjega tipa BY4741, kar je bilo v skladu z na-imi pri akovanji. Z metodo TLC smo tako potrdili hipotezo, da protein Tum1 vpliva na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*. Hkrati smo pokazali, da metoda Nile red ni dovolj natan na, da bi zaznala razlike v vsebnosti lipidov med preiskovanimi sevi.

5.3.2.2 Vpliv integracije mi-jega gena *TST* v genom kvasovke *S. cerevisiae* na lipidni metabolizem

Prednosti, ki jih ima kvasovka *S. cerevisiae* kot modelni organizem, so nas pripeljale do eksperimenta, v katerem smo kvasni gen *TUM1* nadomestili z njegovim potencialnim homologom, to je mi-ji gen *TST*. Zapis za ta gen smo pridobili s pomo jo pomnoevanja mi-je cDNA, ki so jo pripravili v laboratoriju prof. dr. Simona Horvata. Eksperiment smo naredili z namenom, da bi preverili zastavljeno hipotezo, da se sesalski *TST* in *TUM1* kvasovke sta homologna gena z ohranjeno funkcijo. Mi-ji gen *TST* in kvasni gen *TUM1* smo v kvasovko *S. cerevisiae* vstavili na dva na ina ó (1) v kromosom pod uravnavo nativnega promotorja *TUM1*pr oziroma (2) pod uravnavo promotorja *ADH1*pr na plazmidu, s katerim smo nato transformirali kvasne celice.

Pokazali smo da, medtem ko vrnitev gena *TUM1* v genom seva BY4741 *tum1Δ* na mesto delecije vrne fenotip oziroma vsebnost SE na raven divjega tipa BY4741, se to pri vstavitvi mi-jega gena *TST* na enak na in ne zgodi (Sl. 19). Iz tega lahko sklepamo, da mi-ji gen *TST* ne more nadomestiti kvasnega gena *TUM1*. Vendar smo pokazali tudi, da je vsebnost TAG pri sevu BY4741 *tum1Δ::TST* vi-ja kot pri drugih dveh primerjanih sevih, to sta divji tip BY4741 in delecijski sev BY4741 *tum1Δ* (Sl. 19). Ugotovili smo, da moramo za razjasnitev funkcije *TUM1* in *TST* oziroma preveritev hipoteze, da sta sesalski *TST* in *TUM1* kvasovke homologna gena z ohranjeno funkcijo, izvesti dodatne eksperimente.

Med sevoma BY4741 *tum1Δ* [*ADHIpr*] in BY4741 *tum1Δ* [*ADHIpr-TST*] in sevoma BY4741 *tum1Δ* [*ADHIpr*] in BY4741 *tum1Δ* [*ADHIpr-TUM1*] opazimo enak trend v vsebnosti TAG, vsebnosti TAG so med pari sevov primerljive (Sl. 20-23), kar kafe na to, da je kvasni gen *TUM1* mogo e nadomestljiv z mi-jim genom *TST*. Vendar pa tega ne moremo trditi zaradi tega, ker pri sevih BY4741 in BY4741 *tum1Δ* s praznim plazmidom in plazmidom s *TUM1* pod promotorjem *ADHIpr* nismo imeli dovolj biolo-kih ponovitev, da bi lahko govorili o zna ilnih razlikah v vsebnosti lipidov. Z dodatnimi biolo-kimi ponovitvami metode TLC, ki se fle izvajajo, bomo v prihodnosti morda lahko zaklju ili o nadomestljivosti kvasnega gena *TUM1* z mi-jim genom *TST*.

Mi-ji gen *TST* oziroma kvasni *TUM1* smo v kvasovko *S. cerevisiae* vstavili na dva na ina zato, da bi primerjali raven izraflanja pod dvema razli nima promotorjema (nativni promotor *TUM1pr* in mo an promotor *ADHIpr*) na metabolizem lipidov. Pokazali smo, da koli ina izraflenega proteina Tst vpliva na vsebnost TAG v kvasovki *S. cerevisiae*. Trenda sta v delecijem sevu BY4741 *tum1Δ* glede na uporabljen promotor ravno obratna. Ko integriramo *TST* v genom, opazimo trend vi-anja, na drugi strani opazimo trend niflanja TAG v primeru, ko *TST* izrazimo pod mo nim promotorjem *ADHIpr* na plazmidu. Prav tako na vsebnost lipidov vpliva sev kvasovke *S. cerevisiae*, v katerem Tst izraflamo. Z orodji, ki smo jih uporabili, ne moremo narediti zaklju ka o funkcionalni homologiji genov *TUM1* in *TST* oziroma aktivnosti mi-jega Tst v celici kvasovke *S. cerevisiae*.

Hipoteze, da sta sesalski *TST* in *TUM1* kvasovke sta homologna gena z ohranjeno funkcijo tako ne moremo niti potrditi niti ovre i. Za eno ali drugo potrebujemo dodatne eksperimente, predvsem pa ve biolo-kih ponovitev analize TLC s sevi, ki imajo na plazmidu pod *ADHIpr* vstavljen kvasni gen *TUM1*.

5.4 PROTEIN Tum1 NE VPLIVA NA LIPIDNI METABOLIZEM PREKO TIOLACIJE tRNA

Leidel in sod. (2009) so z urea-poliakrilamidno gelsko elektroforezo z APM pokazali, da v delecijem sevu *uba4Δ* in *urm1Δ* manjka frakcija tioliranega uracila ter dokazali, da je biokemijska pot URM1 pomembna za tiolacijo ohlapnega uridina. V biokemijski poti

URM1 sodeluje tudi kvasni gen *TUM1* (Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009) (Sl. 7). Za testiranje prisotnosti tioliranega ohlapnega uridina molekul tRNA smo zato izbrali tri seve: divji tip BY4741 ter delecijaska seva BY4741 *tum1* Δ in BY4741 *uba4* Δ .

Potrdili smo, da v delecijaskem sevu BY4741 *uba4* Δ molekule tRNA niso tiolirane (Sl. 24). Rezultat je bil pri akovan, saj je *UBA4* nujno potreben za tiolacijo ohlapnega uridina molekul tRNA. Na drugi strani so pri kontroli ó divjem tipu BY4741 ó molekule tRNA tiolirane. Tudi slednji rezultat je v skladu s pri akovanji in primerljiv z rezultati raziskave Noma in sod (2009). Vzorca izolirane tRNA iz divjega tipa BY4741 in delecijaska seva BY4741 *uba4* Δ sta nam sluffila kot kontroli za dolo anje delefla tiolacije tRNA seva BY4741 *tum1* Δ . V tem delecijaskem sevu je le manj-a frakcija molekul tRNA tioliranih (Sl. 24). Na- rezultat potrjuje ugotovitev dveh raziskovalnih skupin (Noma in sod., 2009 in Leidel in sod., 2009), ki pravita, da Tum1 ni nujno potreben za tiolacijo tRNA, vendar je pomemben v biokemijski poti URM1 za uspe-en nastanek 2-tiouridina. Tiolacija tRNA tako delno lahko pote e preko poti, v kateri Tum1 ni prisoten.

Na urea-poliakrilamidnem gelu z APM smo testirali tudi delefl tiolacije molekul tRNA, izoliranih iz sevov BY4741 [*ADH1pr*], BY4741 *tum1* Δ [*ADH1pr*], BY4741 [*ADH1pr-TUM1*] in BY4741 *tum1* Δ [*ADH1pr-TST*]. V skladu s pri akovanji je bila po transformaciji praznih plazmidov tiolacija molekul tRNA v delecijaskem sevu BY4741 *tum1* Δ zmanj-ana glede na divji tip BY4741 (Sl. 25). Po tem, ko smo na plazmidu pod promotorjem *ADH1pr* izrazili *TUM1*, se je tiolacija vrnila na raven divjega tipa s praznim plazmidom. Izraflanje *TUM1* pod promotorjem *ADH1pr* tako uspe-no vrne tiolacijo molekul tRNA na nivo divjega tipa. Presenetljivo, se to ni zgodilo v primeru, ko smo na plazmidu pod promotorjem *ADH1pr* izrazili mi-ji gen *TST*. Molekulska funkcija Tst in Tum1 je sicer enaka ó oba spadata v družino proteinov, ki sluffijo kot vsestranski prena-alcil fveplovega atoma (ang. »thiosulfate sulfurtransferase« in ang. »3-mercaptopyruvate sulfurtransferase«) (Gliubich in sod., 1996; Spallosa in sod., 2004; Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009). Pri akovali smo, da bo mi-ji Tst prena-al fveplov atom iz istih substratov kot kvasni Tum1. Pokazali pa smo, da mi-ji Tst ne more nadomestiti kvasnega Tum1 v biokemijski poti URM1 oziroma tiolaciji ohlapnega uridina molekul tRNA kvasovke *S. cerevisiae*.

V nadaljevanju nas je zanimal mehanizem, preko katerega Tum1 vpliva na metabolizem lipidov. Postavili smo hipotezo, da Tum1 vpliva na lipidni metabolizem preko tiolacije tRNA. Izvedli smo eksperiment, ki nam je neposredno pokazal, da hipotezo lahko ovrfemo. Z metodo TLC smo namre pokazali, da je lipidni fenotip delecijaska seva BY4741 *uba4* Δ enak divjemu tipu (Sl. 25). Protein Uba4 deluje na kasnej-em koraku od Tum1 v biokemijski poti URM1 (Sl. 7). Predvidevali smo, da bi bil v primeru, e bi vpliv na lipidni metabolizem potekal preko poti URM1, lipidni fenotip delecijaska seva BY4741 *uba* Δ enak delecijaskemu sevu BY4741 *tum1* Δ . Ker se je pokazal ravno obraten

rezultat ó lipidni fenotip delecijekega seva BY4741 *uba4*Δ je enak divjemu tipu, predpostavljamo, da Tum1 ne vpliva na lipidni fenotip preko biokemijske poti URM1oziroma tiolacije ohlapnega uridina molekul tRNA.

5.5 PREKOMERNO IZRAFIANJE TREH VRST tRNA (tQ^{UUG}, TK^{UUU} in tE^{UUC}) V DELECIJSKIH SEVIH *tum1*Δ in *uba4*Δ NE VRNE LIPIDNEGA FENOTIPA NA NIVO DIVJEGA TIPa

Pokazano je bilo, da prekomerno izraflanje treh specifi nih vrst molekul tRNA (tQ^{UUG}, TK^{UUU} in tE^{UUC}) supresira slab-o rast delecijejskih sevov *ncs2*Δ in *ncs6*Δ na goji- u YPD z dodanim rapamicinom (2 nM). Proteina Ncs2 in Ncs6 sodelujeta v biokemijski poti URM1oziroma pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA (Sl. 7) (Noma in sod., 2009). Na drugi strani prekomerno izraflanje specifi nih molekul tRNA v delecijejskem sevu BY4741 *tum1*Δ ne vrne rasti na YPD goji- u z dodanim rapamicinom (2 nM) na raven divjega tipa. Ta rezultat kafe na to, da ima Tum1 -e dodatne vloge, ki pa so za zdaj -e neznane (Leidel in sod., 2009).

V magistrski nalogi smo pokazali, da prekomerno izraflanje treh specifi nih molekul tRNA (tQ^{UUG}, TK^{UUU} in tE^{UUC}) ne supresira lipidnega fenotipa opaflenega v BY4741 *tum1*Δ sevu (Sl. 27). Glede na rezultate tega eksperimenta ne moremo potrditi hipoteze, da je vpliv Tum1 na vsebnost SE povezan z njegovo vlogo v tiolaciji tRNA (Sl. 7). To je tudi v skladu z rezultati na urea-poliakrilamidnem gelu z APM, kjer smo pokazali, da mi-ji protein Tst ne more nadomestiti kvasnega proteina Tum1 v biokemijski poti URM1.

Na drugi strani med divjim tipom BY4741 [pABY] in delecijejskim sevom BY4741 *tum1*Δ [pABY] ne opazimo zna ilne razlike v vsebnosti SE, kakr-na se kafe med sevoma BY4741 in BY4741 *tum1*Δ (Sl. 18). Vzrok za to je verjetno minimalno goji- e, v katerem so bile gojene kvasne celice z dodanim plazmidom pABY oziroma neoptimiziranost metode TLC za tak-na goji- a, kar se kafe tudi v ve jih standardnih odklonih (prof. dr. Klaus Natter, osebna komunikacija).

5.6 PREDPOSTAVLJEN MEHANIZEM VPLIVA KVASNEGA PROTEINA Tum1 NA LIPIDNI METABOLIZEM

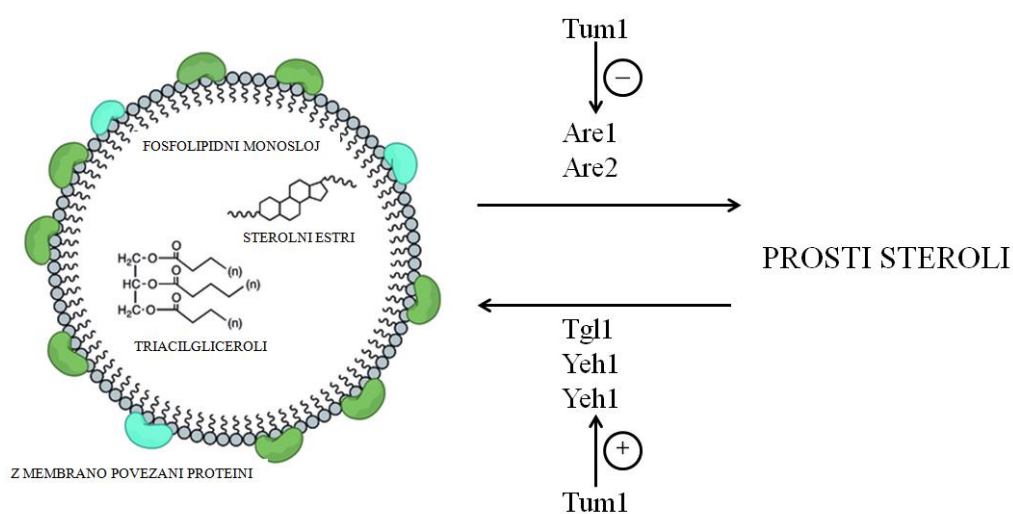
Vpra-anje, ki se pojavi v nadaljevanju je, kak-en je mehanizem vpliva proteina Tum1 na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*.

Za postavljanje nadaljnjih hipotez lahko izhajamo iz na-e ugotovitve, da Tum1 vpliva na raven SE in sicer, da njegova odsotnost (BY4741 *tum1*Δ) povzro i zna ilno povi-anje vsebnosti SE v kvasovki *S. cerevisiae* (Sl. 18). SE skupaj s TAG spadajo med nepolarne lipide, ki jih kvasovka *S. cerevisiae* skladi-i v lipidnih kapljah (Athenstaedt in sod., 1999;

Czabany in sod., 2008; Grillitsch in sod., 2012). S skladi-enjem se kvasovke izognejo toksi nim efektom, ki jih povzro ajo proste MK in steroli. Steroli se tako zaestrijo v SE, proste MK pa se poveflejo tudi z glicerolom in tvorilo triacilglicerole (TAG) (Zweytick in sod., 2000). Za metabolizem SE so nujno potrebni geni *ARE1*, *ARE2*, *TGL1*, *YEH1* in *YEH2*.

Pri nastanku SE sta nujno potrebna *ARE1* in *ARE2* (Yang in sod., 1996; Zweytick in sod., 2000). V dvojni delecijski mutanti *are1Δare2Δ*, ki raste normalno hitro, je sinteza SE popolnoma zavrt, kar kaffe na to, da sta Are1 in Are2 edina proteina, ki sodelujeta pri biosintezi SE pri kvasovki *S. cerevisiae*. V tak-nih sevih je biosinteza sterolov zmanj-ana, vendar je povi-ana vsebnost prostih sterolov (Zweytick in sod., 2000). Za raziskovanje mehanizma vpliva *TUM1* na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae* bi bilo v prihodnosti zanimivo izmeriti vsebnost prostih sterolov v delecijem sevu BY4741 *tum1Δ*. Mogo e je, da Tum1 delno inhibira delovanje Are1 ali/in Are2. Tako je v divjem tipu, ko je Tum1 prisoten, vsebnost SE nifja kot v delecijem sevu BY4741 *tum1Δ*, kjer proteina Tum1 ni in zato ne more delno inhbirati sinteze SE. Predpostavljamo, da je raven SE zaradi tega vi-ja v delecijem sevu.

Cepitev SE na sterole in proste MK poteka s hidrolazami Tgl1, Yeh1 in Yeh2 (Koffel in sod., 2005; Mullner in sod., 2005). Mutanta *tgl1Δyeh1Δyeh2Δ* popolnoma izgubi zmofnost za razgradnjo SE, kar kaffe na to, da so geni *TGL1*, *YEH1* in *YEH2* edini, ki v kvasovki kodirajo SE hidrolaze (Koffel in sod., 2005). Protein Tum1 morda aktivira proteine Tgl1, Yeh1 in Yeh2. V divjem tipu, kjer je Tum1 prisoten, ta spodbuja (aktivira) razgradnjo SE. Na drugi strani, v delecijski mutanti BY4741 *tum1Δ*, kje proteina Tum1 ni, razgradnja SE poteka v manj-em obsegu, zato je posledi no prisotnih ve SE.



Slika 28: Predpostavljen mehanizem delovanja proteina Tum1. Protein Tum1 predvidoma deluje inhibitorno na Are1 in Are2, aktivira pa Tgl1, Yeh1 in Yeh2. Slika lipidne kaplje povzeta po Wikipedii.

Vse hipoteze, postavljene v tem poglavju, temeljijo na podatkih iz literature in niso ugotovitvi o značilnem povečanju vsebnosti SE v delecijem sevju BY4741 *tum1Δ* glede na divji tip. Za njihovo potrditev so potrebni dodatni eksperimenti.

6 SKLEPI

- Kvasni protein Tum1 vpliva na metabolizem lipidov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Delecija gena *TUM1* povzro i pove ano vsebnost sterolnih estrov v kvasovki *S. cerevisiae*.
- Mi-ji protein Tst lahko sintetiziramo v kvasovki *S. cerevisiae*.
- Rekombinantni protein Tst ne more nadomestiti Tum1 v biokemijski poti URM1, tiolaciji tRNA.
- Protein Tum1 ne vpliva na metabolizem lipidov preko biokemijske poti URM1, temve preko druge, -e neznane biokemijske poti.
- Za preveritev hipoteze, da sta produkta genov *TUM1* in *TST* funkcijska homologa, so potrebni dodatni eksperimenti.

7 POVZETEK

Do danes je bilo odkritih fle mnogo genov, katerih produkti sodelujejo pri lipidnem metabolizmu, vendar odkritja novih genov kafeje na to, da verjetno -e ne poznamo vseh. Na-a raziskovalna skupina se ukvarja z iskanjem novih genov, vpletenih v uravnavo lipidnega metabolizma v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, modelnem evkariontskem organizmu. Predhodno je bilo pokazano, da mi-ji gen *TST* vpliva na metabolizem lipidov. V magistrski nalogi nas je zanimalo, ali homolog mi-jega gena *TST*, kvasni gen *TUM1*, tudi vpliva na metabolizem lipidov in ali je vpliv izraflanja *TUM1* in *TST* v kvasovki na lipidni fenotip primerljiv ter preko katerega mehanizma poteka.

Edina do danes edina opisana biolo-ka vloga Tum1 je pri tiolaciji ohlapnega uridina molekule tRNA, kjer s proteini Nfs1, Uba4, Urm1, Ncs2 in Ncs6 sestavlja biokemijsko pot URM1. Tri vrste tRNA, specifi ne za glutamin (tQ^{UUG}), lizin (tK^{UUU}) oziroma glutaminsko kislino (tE^{UUC}), imajo na mestu ohlapnega nukleotida uridin spremenjen v 5-metoksikarbonilmetil-2-tiouridin. Protein Tum1 ni nujno potreben za tiolacijo ohlapnega uridina, je pa bil opisan kot soudelefenec v tej poti (Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009).

Z relativno enostavnim testom, ki nam pove, ali dolo en gen vpliva na lipidni metabolizem ó oleatnim testom, smo pokazali, da je rast delecijjskih sevov *ncs2Δ*, *ncs6Δ*, *tum1Δ*, *uba4Δ* in *urm1Δ* na oleatnem goji- u enaka rasti divjega tipa. Rezultat kafe na to, da produkti slednjih genov, med katerimi je tudi Tum1, niso vpleteni v metabolizem lipidov. Ker na podlagi oleatnega testa -e ne moremo narediti dokon nih zaklju kov, smo v nadaljevanju izvedli tankoplastno kromatografijo (ang. »thin layer chromatography«, TLC). Ugotovili smo, da Tum1 vpliva na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*, saj delecija gena *TUM1* povzro i pove ano vsebnost sterolnih estrov (SE). Hkrati smo pokazali, da metoda Nile red za zaznavanje teh razlik ni dovolj natan na. Vsebnost lipidov smo primerjali v delecijjskem sevu *tum1Δ*, divjem tipu in delecijjskem sevu *tum1Δ*, v katerega smo vrnili *TUM1*. Izmerili smo tudi vsebnost treh razli nih vrst lipidov ó ergosterola, triailgliceridov (TAG) in SE ó v sevu *tum1Δ::TST*. Na osnovi rezultatov ne moremo trditi, da je vsebnost sterolnih estrov v slednjem sevu razli na od delecijjskega seva BY4741 *tum1Δ*. Nenazadnje, z uporabo dveh razli nih promotorjev ó *ADH1pr* in *TUM1pr* ó smo ugotovili, da je vpliv proteina Tum1 in Tst na lipidni fenotip kvasovke *S. cerevisiae* odvisen od ravni izraflanja oziroma vrste promotorja.

Z urea-poliakrilamidno elektroforezo z dodanim APM smo pokazali, da ostane defle molekul tRNA v delecijjskem sevu *tum1Δ* tioliran, medtem, ko pri sevu *uba4Δ* molekule tRNA niso tiolirane, kar je v skladu z rezultati predhodnih raziskav. Zmanj-an defle tiolacije molekul tRNA kafe na to, da ne poteka vsa tiolacija molekul tRNA preko proteina Tum1 in potrjuje, da protein Uba4 deluje na poznej-em koraku od Tum1 v biokemijski poti

URM1 in da je nujno potreben za tiolacijo ohlapnega uridina molekul tRNA (Noma in sod., 2009; Leidel in sod., 2009). Ker nas je zanimalo, ali *TST* lahko nadomesti *TUM1* v biokemijski poti URM1, smo iz seva *tum1* Δ [*ADH1pr-TST*] izolirali molekule tRNA in primerjali njihovo tioliranost z molekulami tRNA, izoliranimi iz seva *tum1* Δ [*ADH1pr-TUM*]. Pred tem smo s prenosom western potrdili prisotnost proteina Tst v kvasovki. Medtem ko je izraflanje *TUM1* pod promotorjem *ADH1pr* v delecijem sevu *tum1* Δ vrnilo delef tiolacije na nivo divjega tipa, se to ni zgodilo ob prekomernem izraflanju gena *TST* pod kontrolo istega promotorja. Mi-ji Tst torej ne more nadomestiti kvasnega proteina Tum1 v biokemijski poti URM1 za tiolacijo tRNA kvasovke *S. cerevisiae*. V nadaljevanju smo izvedli metodo TLC, s katero smo pokazali, da je vsebnost TAG in SE v divjem tipu in delecijem sevu *uba4* Δ enaka, kar kaffe na to, da vloga Tum1 pri modifikaciji tRNA ni povezana z vlogo Tum1 pri lipidnem metabolizmu. Da bi hipotezo dodatno preverili, smo izvedli dodaten eksperiment, pri katerem smo v delecijem sevih prekomerno izrazili tri specifi ne vrste tRNA, to so tK^{UUU}, tE^{UUC} in tQ^{UUG}, katerih prekomerno izraflanje suprimira mutacije v biokemijski poti URM1. Prekomerno izraflanje teh specifi nih vrst tRNA ni vrnilo lipidnega fenotipa delecijskega seva *tum1* Δ na nivo divjega tipa.

Zaklju imo lahko, da protein Tum1 vpliva na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae*, vendar ne preko biokemijske poti URM1, temve preko druge, do zdaj -e neznane poti. Glede na rezultate vpliva *TST* na lipidni metabolizem kvasovke *S. cerevisiae* pa ne moremo niti potrditi niti ovre i hipoteze o funkcijski homologiji kvasnega gena *TUM1* in mi-jega gena *TST*. Za preveritev te hipoteze so potrebni dodatni eksperimenti.

8 VIRI

- Aashiq H. K., Jon M. L., Christopher M. Y., Austin G. M., Claus O. W., Edward M. M. 2015. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science*, 348, 6237: 921-925
- Adeyo O., Horn P. J., Lee S., Binns D. D., Chandrahas A., Chapman K. D., Goodman J. M. 2011. The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *Journal of Cellular and Molecular Biology*, 192: 1043-1055
- Agris P.F. 1991. Wobble position modified nucleosides evolved to select transfer RNA codon recognition: a modified-wobble hypothesis. *Biochimie*, 73: 1345-1349
- Agris P.F., Soll D., Seno T. 1973. Biological function of 2-thiouridine in *Escherichia coli* glutamic acid transfer ribonucleic acid. *Biochemistry*, 12: 4331-4337
- Arthington-Skaggs B. A., Crowell D. N., Yang H., Sturley S. L., Bard M. 1996. Positive and negative regulation of a sterol biosynthetic gene (*ERG3*) in the post-squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS Letters*, 392: 161-165
- Ashraf S.S., Sochacka E., Cain R., Guenther R., Malkiewicz A., Agris P.F. 1999. Single atom modification (O⁶S) of tRNA confers ribosome binding. *RNA*, 5: 188-194
- Athenstaedt K., Zweytick D., Jandrositz A., Kohlwein S. D., Daum G. 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 181: 6441-6448
- Athenstaedt K., Daum G. 1997. Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 179: 7611-7616
- Athenstaedt K., Daum G. 2003. YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 23317-23323
- Athenstaedt K., Daum G. 2005. Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 37301-37309
- Bagnat M., Keranen S., Shevchenko A., Simons K. 2000. Lipid raft function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 3254-3259

- Baldauf S. L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19: 345-351
- Binns D., Januszewski T., Chen Y., Hill J., Markin V. S., Zhao Y., Gilpin C., Chapman K. D., Anderson R. G., Goodman J. M. 2006. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *Journal of Cellular Biology*, 173, 5: 719-731
- Black P. N., DiRusso C. C. 2007. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 286-298
- Blackburn E.H. 2010. Telomeres and telomerase: the means to the end (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 41: 7405-7421
- Bordo D., and Bork P. 2002. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports*, 3: 741-746
- Bordo D., Bork P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily - Sequence-structure-function relations. 2002. *Embo Reports*, 3: 741- 746
- Botstein D., Chervitz S.A., Cherry J.M. 1997. Yeast as a model organism. *Science*, 277, 5330: 1259-1260
- Brookheart R.T., Michel C.I., Schaffer J.E. 2009. As a matter of fat. *Cell Metabolism*, 10: 9-12
- Carman G. M., Han G-S. 2011. Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Biochemistry*, 80: 859-883
- Casey W. M., Rolph C. E., Tomeo M. E., Parks L. W. 1993. Effects of unsaturated fatty acid supplementation on phospholipid and triacylglycerol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193, 3: 1297-1303
- Chen X., Zhang J. 2012. The Ortholog Conjecture Is Unstable by the Current Gene Ontology but Is Supported by RNA Sequencing Data. *PLOS Computational Biology*, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002784: str. 13
- Choudhary V., Schneider R. 2009. Monitoring sterol uptake, acetylation, and export in yeast. *Methods in Molecular Biology*, 580: 221-232
- Connerth M., Czabany T., Wagner A., Zellnig G., Leitner E., Steyrer E., Daum G. 2010. Oleate inhibits sterol ester synthesis and causes liposensitivity in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 26832-26841

- Crick F. H. 1966. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, 19: 548-655
- Czabany T., Athenstaedt K., Daum G. 2007. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 299-309
- Czabany T., Wagner A., Zweytick D., Lohner K., Leitber E., Inglic E., Daum G. 2008. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 17065-17074
- Dahl J. U., Urban A., Bolte A., Sriyabhaya P., Donahue J. L., Nimtz M., Larson T. J., Leimkuhler S. 2011. The identification of a novel protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 35801-35812
- Daum G., Klug L. 2014. Yeast lipid metabolism at a glance. *Yeast research*, 14: 369-388
- Daum G., Lees N. D., Bard M., Dickson R. 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1471-1510
- Dickson R. C., Sumanasekera C., Lester R. L. 2006. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in lipid research*, 45: 447-465
- Dolinski K., Botstein D. 2007. Orthology and functional conservation in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41: 465-507
- Douzery E.J.P., Snell E.A., Baptiste E., Delsuc F., Philippe H. 2004. The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 43: 15386-15391
- Eisenberg T., Buttner S. 2013. Lipids and cell death in yeast. *FEMS Yeast research*, 14, 1: 179-197
- Escriba P. V., Gonzalez-Ros J. M., Goni F. M., Kinnunen P. K., Vigh L., Sanchez-Magraner L., Fernandez A.M., Busquets X., Horvath I., Barcelo-Coblijn G. 2009. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12: 829-875
- Fahy E., Cotter D., Sud M., Subramaniam S. 2011. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811: 637-667
- Fei W., Wang H., Fu X., Bielby C., Yang H. 2009. Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 424: 61-67

- Fields S., Johnston M. 2005. Cell biology. Whither model organism research? *Science*, 307, 5717: 1885-1886
- Fitch, W. M. 1970. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Zoology*, 19: 99-106
- Frost A., Elgor M.G., Brandman O., Ives C., Collins S.R., Miller-Vedam L., Weibezahn J., Hein M.Y., Poser I., Mann M., Hyman A.A., Weissman J.S. 2012. Functional Repurposing Revealed by Comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* Genetic Interactions. *Cell*, 149: 1339-1352
- Garbarino J., Sturley S. L. 2005. Homeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochemical Society Transactions*, 33, 5: 1182-1185
- Garbarino J., Sturley S.L. 2009. Saturated with fat: new perspective on lipotoxicity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 12, 2: 110-116
- Ghaemmaghami S., Huh W. K., Bower K., Howson R. W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E. K., Weissman J. S. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425, 6959: 737-741
- Gliubich F., Gazerro M., Zanotti G., Delbono S., Bombieri G., Berni R. 1996. Active site structural features for chemically modified forms of rhodanese. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 21054-21061
- Goehring A. S., Rivers D. M., Sprague G. F. J. 2003. Attachment of the Ubiquitin-Related Protein Urm1p to the Antioxidant Protein Ahp1p. *Eukaryotic cell*, 2, 5: 930-936
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546: 563-567
- Grillitsch K., Connerth M., Kofeler H., Arrey T. N., Rietschel B., Wagner B., Karas M., Daum G. 2011. Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: lipidome meets proteome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811: 1165-1176
- Guan X. L., Souza C. M., Dewhurst G., Schaad O., Kajiwara K., Wakabayashi H., Ivanova T., Castillon G. A., Piccolis M. 2009. Functional Interactions between Sphingolipids and Sterols in Biological Membranes Regulating Cell Physiology. *Molecular Biology of the Cell*, 20: 2083-2095

- Guo Y., Cordes K. R., Farese R. V., Walther T. C. 2009. Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science*, 122: 7496752
- Hartwell L.H. 2002. Nobel lecture. Yeast and cancer. *Bioscience Reports*. 22, 3-4: 3736-394
- Henry S. A., Kohlwein S. D., Carman G. M. 2012. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 317-349
- Horvath S. E., Wagner A., Steyrer E., Daum G. 2011. Metabolic link between phosphatidylethanolamin and triacylglycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811: 1030-1037
- Huang B.O., Lu J., Bystrom S. A. 2008. A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 14:218362194
- Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C., Carroll A.S., Howson R.W., Weissman J.S., O'Shea E.K. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425: 6866691
- Jacquier N., Schneider R. 2012. Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129: 70-78
- Kapitzky L., Beltrao P., Berens T.J., Gassner N., Zhou C., Wüster A., Wu J., Babu M.M., Elledge S.J., Toczyski D., Lokey R.S., Krogan N.J. 2010. Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. *Molecular Systems Biology*, 6: 451
- Khan M.J., Alam M.R., Waldeck-Weiermair M., Karsten F., Groschner L., Riederer M., Hallström S., Rockenfeller P., Konya V., Heinemann A., Madeo F., Graier W.F., Malli R. 2012. Inhibition of autophagy rescues palmitic acid-induced necroptosis of endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 25: 211106-21120
- Klug L., Daum G. 2014. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast research*, 14, 3: 369-388
- Koch B., Schmidt C., Daum G. 2014. Storage lipids of yeast: a survey of nonpolar lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 5: 892-915

- Koffel R., Schneiter R. 2006. Yeh1 constitutes the major steryl ester hydrolase under heme-deficient conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 5: 1018-1025
- Koffel R., Tiwari R., Falquet L., Schneiter R. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Molecular Cell Biology*, 25: 1655-1668
- Kohlwein S. D., Veenhuis M., van der Klei I. J. 2012. Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat-store 'em up or burn 'em down. *Genetics*, 193: 1-50
- Kohlwein S. D., Petschnigg J. 2007. SLipid-induced cell dysfunction and cell death: lessons from yeast., 9, 6: 455-461
- Koonin E. V. 2005. Orthologs, paralogs and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 39: 309-338
- Koonin E.V. 2011. Walter Fitch and the orthology paradigm. *Briefings in Bioinformatics*, 12: 377-378
- Kramer E.B., Farabaugh P.J. 2007. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA*, 13: 87-96
- Kristan K., Rifnar T. L. 2010. Steroid-transforming enzymes in fungi. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129: 79-91
- Kuchler K., Daum G., Paltauf F. 1986. Subcellular and submitochondrial localization of phospholipid-synthesizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 165: 901-910
- Kumar A., Agarwal S., Heyman J.A., Matson S., Heidtman M., Piccirillo S., Umansky L., Drawid A., Jansen R., Liu Y., Cheung K.H., Miller P., Gerstein M., Roeder G.S., Snyder M. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes & Development*, 16: 707-719
- Kurat C.F., Wolinski H., Petschnigg J., Kaluarachchi S., Andrews B., Natter K., Kohlwein S.D. 2009. *Molecular Cell*, 33: 53-63
- Laxman S., Sutter B. M., Wu X., Kumar S., Guo X., Trudgian D. C., Mirzaei H., Tu B. P. 2013. Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell*, 154, 2: 416-429

- Lees N. D., Bard M., Kirsch D. R. 1999. Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 33-47
- Leidel S., Pedrioli P.G.A., Bucher T., Bost R., Costanzo M., Schmidt A., Aebersold R., Boone C., Hofman K., Peter M. 2009. *Nature*, 458: 228-233
- Lim V. I. 1994. Analysis of action of wobble nucleoside modifications on codon-anticodon pairing within the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 240: 8619
- Lipidna kaplja, slika. Wikipedia.
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Lipid_droplet_structure.tif (16. 7. 2015)
- Listenberger L.L., Han X., Lewis S.E., Cases S., Farese R.V., Ory D.S., Schaffer J.E. 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Science* 100: 307763082
- Llinás M. 2001. Total RNA Isolation from *S. cerevisiae*. DeRisi Lab.
<http://derisilab.ucsf.edu/data/pdfs/TotalRNAIsolation.pdf> (13. 5. 2015)
- Looke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50, 5: 325-328
- Lu J., Esberg A., Huang B., and Bystrom A.S. 2008. *Kluyveromyces lactis* g-toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. *Nucleic Acids Research*, 36: 107261080
- Lu J., Huang B., Esberg A., Johansson M.J., Bystrom. A.S. 2005. The *Kluyveromyces lactis* g-toxin targets tRNA anticodons. *RNA*, 11: 164861654
- Martin R.P., Schneller J.M., Stahl A.J., Dirheimer G. 1979. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C6U6U) into yeast mitochondria. *Biochemistry*, 18: 460064605
- Mullner H., Deutsch G., Leitner E., Ingolic E., Daum G. 2005. YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 13321613328
- Nadolski M. J., Linder M. E. 2007. Protein lipidation. *FEBS Journal*, 274: 5202-5210
- Nagiec M. M., Baltisberger J. A., Wells G. B., Lester R. L., Dickson R. C. 1994. The *LCB2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and the related *LCB1* gene encodes subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91: 7899-7902

- Nakai Y., Umeda N., Suzuki T., Nakai M., Hayashi H., Watanabe K., Kagamiyama H. 2004. Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 12363-12368
- Natter K., Leitner P., Faschinger A., Wolinski H., McCraith S., Fields S., Kohlwein S. D. 2005. The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Molecular Cell Proteomics*, 4: 662-672
- Navina S., Acharya C., DeLany J.P., Orlichenko L.S., Baty C.J., Shiva S.S., Durgampudi C., Karlsson J.M., Lee K., Bae K.T., Furlan A., Behari J., Liu S., McHale T., Nichols L., Papachristou G.I., Yadav D., Singh V.P. 2011. Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity. *Science Translational Medicine*, 3, 107: 107-110
- Nehrt N.L., Clark W.T., Radivojac P., Hahn M.W. 2011. Testing the Ortholog Conjecture with Comparative Functional Genomic Data from Mammals. *PLOS Computational Biology*, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002073
- Nelson G. J. 1975. Fractionation of phospholipids, in *Analysis of Lipids and Lipoproteins*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 4: 70-89
- Nes W. D., Janssen G. G., Crumley F. G., Kalinowska M., Akihisa T. 1993. The structural requirements of sterols for membrane function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300: 724-733
- Nielsen J. 2009. Systems biology of lipid metabolism: from yeast to human. *FEBS Letters*, 583, 24: 3905-3913
- Nirenberg M. 2004. Historical review: deciphering the genetic code—a personal account. *Trends in Biochemical Sciences*, 29: 466-474
- Noma A., Sakaguchi Y., Suzuki T. 2009. Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Research*, 37: 1335-1352
- Nurse, P.M. 2002. Nobel lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Bioscience Reports*, 22: 487-499.
- O'Brien K. P., Remm M., Sonnhammer E. L. L. Inparanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs. 2005. *Nucleic Acids Research*, 33: 476-480
- Palenchar P. M., Buck C. J., Cheng H., Larson T. J., Mueller E. G. 2000. Evidence that ThiI, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a

- sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 828368286
- Parks L. W., Casey W. M. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Review of Microbiology*, 49: 95-116
- Petschnigg J., Wolinski H., Kolb D., Zellnig G., Kurat C. F., Natter K., Kohlwein S. D. 2009. Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 30981630993
- Petschnigg J., Wolinski H., Kolb D., Zellnig G., Kurat C. F., Natter K., Kohlwein S. D. 2009. Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 45: 30981-30993
- Pi-kur J., Compagno C. 2014. *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. Springer, 169-215
- Ploegh H. L. 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 448: 4356438
- Ploier B., Scharwey M., Koch B., Schmidt C., Schatte J., Rechberger G., Kollroser M., Hermetter A., Daum G. 2013. Screening for hydrolytic enzymes revealed Ayr1p as a novel triacylglycerol lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 36061636072
- Poirey R., Jauniaux J.C. 1997. Sequencing Analysis of a 36.8 kb Fragment of Yeast Chromosome XV Reveals 26 Open Reading Frames Including SEC63, CDC31, SUG2, GCD1, RBL2, PNT1, PAC1 and VPH1. *Yeast*, 13: 4836487
- Poirier Y., Antonenkov V. D., Glumoff T., Hiltunen J. K. 2006. Peroxisomal β -oxidation-a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 1413-11426
- Progress in Yeast Glycosylation Engineering. 2015. Hamilton S. R., Zha D. *Methods in Molecular Biology*, 1321: 73-90
- Rajakumari S., Grillitsch K., Daum G. 2008. Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in Lipid Research*, 47: 1576171
- Rego A., Trindade D., Chaves S. R., Manon S., Costa V., Sousa M. J. Corte-Real M. 2014. The yeast model system as a tool towards the understanding of apoptosis regulation by sphingolipids. *FEMS Yeast Research*, 14: 1606178

- Rio D.C., Ares M.Jr, Hannon G.J., Nilsen T.W. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of RNA. 2010. Cold Spring Harbor Protocols, 6: 1-6, doi:10.1101/pdb.prot5445
- Rostron K., Rolph C. E, Lawrence C. L. 2015. Nile red fluorescence screening facilitating neutral lipid phenotype determination in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108: 97-106
- Rozenski J., Crain P.F., McCloskey J.A. 1999. The RNA modification database: 1999 update. *Nucleic Acids Research*, 27: 1966-1977
- Ryan C.J., Roguev A., Patrick K., Xu J., Jahari H., Tong Z., Beltrao P., Shales M., Qu H., Collins S.R., Kliegman J.I., Jiang L., Kuo D., Tosti E., Kim H.S., Edelman W., Keogh M.C., Greene D., Tang C., Cunningham P., Shokat K.M., Cagney G., Svensson J.P., Guthrie C., Espenshade P.J., Ideker T., Krogan N.J. 2012. Hierarchical Modularity and the Evolution of Genetic Interactomes across Species. *Molecular Cell*, 46, 5: 691-704
- Saccharomyces* genome database, *Saccharomyces cerevisiae* Genome Snapshot. <http://www.Yeastgenome.org/genomesnapshot> (20. 7. 2015)
- Saleem R. A., Knobloch B., Mast F. D., Smith J. J., Boyle J., Dobson C. M., Long-O'Donnell R., Rachubinski R. A., Aitchison J. D. 2008. Genome-wide analysis of signaling networks regulating fatty acid-induced gene expression and organelle biogenesis. *Journal of Cellular Biology*, 181, 2: 281-292
- Sandager L., Gustavsson M. H., Stahl U., Dahlqvist A., Wiberg E., Banas A., Lenman M., Ronne H., Szymne S. 2002. Storage lipid synthesis is non-essential in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 64786-6482
- Schaffer J.E. 2003. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, 14: 281-287
- Schmidt C., Athenstaedt K., Koch B., Ploier B., Daum G. 2013. Regulation of the yeast triacylglycerol lipase Tgl3p by formation of nonpolar lipids. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 19939-619948
- Schneiter R., Daum G. 2006. Analysis of yeast lipids. *Methods in Molecular Biology. Yeast Protocols*, 313: 75-84
- Sherman F. 1991. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 194: 36-21

- Shibuya N., Tanaka M., Yoshida M., Ogasawara Y., Togawa T., Ishii K., Kimura, H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11: 7036714
- Sickmann A., Reinders J., Wagner Y., Joppich C., Zahedi R., Meyer H.E., Schonfisch B., Perschil I., Chacinska A., Guiard B., Rehling P., Pfanner N., Meisinger C. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100: 13207613212
- Simons K., Sampaio J. L. 2011. Membrane organisation and lipid rafts. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, 3, 10: 1-17
- Sonnhammer E. L., Koonin E. V. 2002. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes. *Trends in Genetics-Cell*, 18: 6196620
- Sorger D., Athenstaedt K., Hrastnik C., Daum G. 2004. A yeast strain lacking lipid particles Bbears a defect in ergosterol formation. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 31190631196
- Souza C. M. Pichler H. 2007. Lipid requirements for endocytosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 442-454
- Spallarossa A., Forlani F., Carpen A., Armirotti A., Pagani S., Bolognesi M., Bordo D. 2004. The "rhodanese" fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases: Crystal structure of SseA from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 335: 583-593
- Studer R. A., Robinson-Rechavi M. 2009. How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? *Trends in Genetics*, 25: 2106216
- Summer H., Gramer R., Droge P. Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Urea PAGE). 2009. *Journal of Visualized Experiments*, 32, e1485, doi: 10.3791/1485
- Sutter B. M., Wu X., Laxman S., Kim S. H., Tu B. P. 2013. Regulation of cell growth and autophagy by methionine and the SAM-responsive methylation of Protein Phosphatase 2A (PP2A). *Cell*, 154, 2: 4036415
- Suzuki T. 2005. Biosynthesis and function of tRNA wobble modifications. Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing. *Topics in Current Genetics*, 12: 246 69

- Sylvers L.A., Rogers K.C., Shimizu M., Ohtsuka E. and Soll D. 1993. A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 32: 383663841
- Szostak J.W. 2010. DNA ends: just the beginning (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 41: 738667404
- Takai K., Yokoyama S. 2003. Roles of 5-substituents of tRNA wobble uridines in the recognition of purine-ending codons. *Nucleic Acids Research*, 31: 638366391
- Tehlivets O., Scheuringer K., Kohlwein S. D. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 255-270
- Tinkelenberg A. H., Liu Y., Alcantara F., Khan S., Guo Z., Bard M., Sturley S. L. 2000. Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 40667640670
- Tiwari R., Koffel R., Schneider R. 2007. An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO Journal*, 26: 5109-5119
- Tong A.H., Evangelista M., Parsons A.B., Xu H., Bader G.D., Page N., Robinson M., Raghibizadeh S., Hogue C.W., Bussey H., Andrews B., Tyers M., Boone C. 2001. Systematic Genetic Analysis with Ordered Arrays of Yeast Deletion Mutants. *Science*, 294, 5550: 2364-2368.
- Tuller G., Nemeč T., Hrašnik C., Daum G. 1999. Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast*. 15: 155561564
- Ubuka T., Ohta J., Yao W. B., Abe T., Teraoka T., Kurozumi Y. 1992. L-Cysteine metabolism via 3-mercaptopyruvate pathway and sulfate formation in rat liver mitochondria. *Journal of Amino Acids*, 2: 1436155
- Uemura H., 2012. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 95: 1-12
- Umeda N., Suzuki T., Yukawa M., Ohya Y., Shindo H., Watanabe K., Suzuki T. 2005. Mitochondria-specific RNA-modifying Enzymes Responsible for the Biosynthesis of the Wobble Base in Mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 2: 161361624

Unger R.H., Orci L. 2002. Lipoapoptosis: its mechanism and its disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585: 202-212

UniProtKB-P52196(THTR_MOUSE)

<http://www.uniprot.org/uniprot/P52196> (22. 7. 2015)

Valachovic M., Hronska L., Hapala I. 2001. Anaerobiosis induces complex changes in sterol esterification pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 197: 41645

Van Meer G., Voelker D. R. Feigenson G. W. 2008. Membrane lipids: where they are and how do they behave. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9: 112-124

Veenhuis M., Mateblowski M., Kunau W. H., Harder W. 1987. Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 3, 2: 77-84

Wagner A., Grillitsch K., Leitner E., Daum G. 2009. Mobilization of steryl esters from lipid particle of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791: 118-124

Western blot. 2012. Universidad de Guadalajara. Otolan. <http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html> (29. 5. 2015)

Winzeler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S.H., Gentalen E., Giaever G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Véronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M., Davis R.W. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285, 5429: 901-906

Wolinski H. 2015. Karl-Franzens-Universitat, Graz. Microscopy. <http://microscopy.uni-graz.at/index.php?item=aboutus> (15. 7. 2015)

Wriessnegger T., Gübitz G., Leitner E., Ingolic E., Cregg J., de la Cruz B. J., Daum G. 2007. Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 4: 455-461

- Yadav P. K., Yamada K., Chiku T., Koutmos M., Banerjee R. 2013. Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 20002620013
- Yang H., Bard M., Bruner D. A., Gleeson A., Deckelbaum R. J., Aljinovic G., Pohl T. M., Rothstein R., Sturley S. L. 1996. Sterol esterification in yeast: two-genes process. *Science*, 272: 1353-1356
- Yasukawa T., Suzuki T., Ishii N., Ohta S., Watanabe K. 2001. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO Journal*, 20: 479464802
- Yasukawa T., Suzuki T., Ishii N., Ueda T., Ohta S., Watanabe K. 2000. Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Letters*, 467: 1756178
- Yokoyama S., Watanabe T., Muraio K., Ishikura H., Yamaizumi Z., Nishimura S., Miyazawa T. 1985. Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 490564909
- Yu C., Kennedy N. J., Chang C. C., Rothblatt J. A. 1996. Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-Coa:sterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 24157-24163
- Zechner R., Zimmermann R., Eichmann T.O., Kohlwein S.D., Haemmerle G., Lass A., Madeo F. 2012. FAT SIGNALS ó lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metabolism*, 15, 3: 2796291
- Zhang H., Bard M., Bruner D. A., Gleeson A., Deckelbaum R. J., Aljinovic G., Pohl T. M., Rothstein R., Sturley S. L. 1996. Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science*, 272: 135361356
- Zinser E., Paltauf F., Daum G. 1993. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175: 2853-2858
- Zinser E., Sperka óGottlieb C. D. Fasch E. V. Kohlwein S. D. Paltauf F. Daum G. 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173: 2026-2034
- Zweytick D., Athenstaedt K., Daum G. 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469: 1016120

Zweytick D., Leitner E., Kohlwein S. D., Yu C., Rothblatt J., Daum G. 2000. Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry, 267: 1075-1082

PRILOGE

Preglednica A: Za etni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje odsekov DNA z verifno reakcijo s polimerazo.

Oznaka	Opis	Nukleotidno zaporedje*
TST_A_F	A PCR: Za pomnoževanje <i>KanMX</i> . Vsebuje –trle i konec za homologno rekombinacijo za <i>TST</i> v sevu BY4741 mfa:: <i>GALPr-TST-NatMX</i>	CCCCAGAGACCCGTGTGTCCCAG GGGAAGAGTGGGAAGGCCTGAGCG GCCGCCAGGGG
TST_A_R	A PCR: Za pomnoževanje <i>KanMX</i> . Trle i konec nalega za <i>TST</i> v sevu BY4741 mfa:: <i>GALPr-TST-NatMX</i>	TCGACCCGGTATCGATAAGCTTGAT ATCGAATTCCTGCAGCCCGGGCAC CTTTAGACATGATGGG
UP_KanMX_F	Za pomnoževanje <i>KanMX</i> . Nalega na za etek <i>KanMX</i> .	GCGGCCGCCAGGGG
DN_KanMX_R	Za pomnoževanje <i>KanMX</i> . Nalega na konec <i>KanMX</i> .	CACCTTTAGACATGATGGG
TST_B_F	B PCR: Za pomnoževanje kasete <i>TST-KanMX</i> . Trle i konec nalega na promotor gena <i>TUM1</i> v sevu <i>tum1Δ</i> .	GAGGACAAAAGCATAAAGTTGTGA AGAAAATTGCCCATACATTCAATGG TACATCAGGTGCTCTA
TUM1_del_rev	B PCR: Za pomnoževanje kasete <i>TST-KanMX</i> . Trle i konec nalega na zaporedje za mestom delecije v sevu <i>tum1Δ</i> .	ATATGTAGCTAAATAAATCGACTTG TCAAGAATATATTTCTCTTACACCT TTAGACATGATGGG
Nov_TUM1_k_R	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje stika med zadnjim delom kasete <i>TST-KanMX</i> in genomom seva <i>tum1Δ</i> . Nalega na genom v sevu <i>tum1Δ</i> za mestom vstavitve.	TACCGGGCAATAACAATGAA
j_KanMX_F	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje stika med zadnjim delom kasete <i>TST-KanMX</i> in sevom <i>tum1Δ</i> . Nalega na zadnji del <i>KanMX</i> .	GGCGTGGGGACAATTCAA
Nov_TUM1_k_F	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje stika med genomom seva <i>tum1Δ</i> in za etnim delom vstavljenе kasete <i>TST-KanMX</i> . Nalega na genom seva <i>tum1Δ</i> pred mestom vstavitve.	GGATGTTAGCTGTGTACA
j_KanMX_R	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje stika med genomom seva <i>tum1Δ</i> in za etnim delom kasete <i>TST-KanMX</i> . Nalega na za etni del <i>KanMX</i> .	GTTAAGTGCGCAGAAAGTAA
Nov_TUM1_k_R	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje prisotnosti kasete <i>TST-KanMX</i> v sevu <i>tum1Δ</i> . Nalega na genom v sevu <i>tum1Δ</i> za mestom vstavitve.	TACCGGGCAATAACAATGAA
01_mTst.F	Za pomnoževanje <i>TST</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v plazmid pCAU s homologno rekombinacijo. Nalega na za etni del <i>TST</i> .	TATTTCAAGCTATACCAAGCATACA ATCAACTATCTCATATACAGAACAC ATGGTACATCAGGTGCTCTACCG
01_mTst.R	Za pomnoževanje <i>TST</i> . Vsebuje vise e konce za vklju itev v plazmid pCAU s homologno rekombinacijo. Nalega na zadnji del <i>TST</i> .	TGGGAGGAGGGCGTGAATGTAAGC GTGACATAACTAATTACATGATCAG GCCTCCCACTCTTCC
02_mTst.F	Za pomnoževanje gena <i>TST</i> iz cDNA. Nalega na zgornji konec <i>TST</i> .	ATGGTACATCAGGTGCTCTACCG

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice A. Za etni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje odsekov DNA z verifno reakcijo s polimerazo.

Oznaka	Opis	Nukleotidno zaporedje*
02_mTst.R	Za pomnoževanje gena <i>TST</i> iz cDNA. Nalega na zadnji del <i>TST</i> .	TCAGGCCTTCCCCTCTTCC
TST_pRD53_F	Za pomnoževanje <i>TST</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v plazmid pRD53 s homologno rekombinacijo. Nalega na za etni del <i>TST</i> .	TTAATATACCTCTATACTTTAACGT CAAGGAGAAAAACAACACAATGG TACATCAGGTGCTCTACCG
TST_pRD53_R	Za pomnoževanje <i>TST</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v plazmid pRD53 s homologno rekombinacijo. Nalega na zadnji del <i>TST</i> .	GTCGACCGGTATCGATAAGCTTGA TATCGAATTCGTACGCCCCGGTC AGGCCTTCCCCTCTTCC
GALpr_TS_T_F	Za pomnoževanje kasete <i>GALpr-TST</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v plazmid pAG25 s homologno rekombinacijo. Nalega na promotor <i>GALI</i> .	GACACTATAGAACGCGGCCGCCAG CTGAAGCTTCGTACGCTGCAGTCA GGCCTTCCCCTCTT
GALpr_TS_T_R	Za pomnoževanje kasete <i>GALpr-TST</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v plazmid pAG25 s homologno rekombinacijo. Nalega na zadnji del <i>TST</i> .	GGCAAGCTAAACAGATCTGGCGCG CCTTAATTAACCCGGGGATCCTTGA ATTTTCAAAAATTTCTACTT
I_GAL_R	Za pomnoževanje kasete <i>GALpr-TST-NatMX</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v lokus <i>MFA1</i> seva BY4741 s homologno rekombinacijo. Nalega na <i>GALpr</i> .	GGTGTAGCGGAAAAGGAAGATAAA GGAGGGAGAACAACGTTTTTGTAC GCAGAAACACTAGTGGATCTGATAT CA
I_GAL_U NI_L	Za pomnoževanje kasete <i>GALpr-TST-NatMX</i> . Vsebuje vise e konce za integracijo v lokus <i>MFA1</i> seva BY4741 s homologno rekombinacijo. Nalega na <i>NatMX</i> .	ATCTGTAACGTTTCTCGGATAAAA CCAAAATAAGTACAAAGCCATCGA ATAGAATATAGAACGCGGCCGCCA
K_GAL_L	Za pomnoževanje kasete <i>GALpr-TST</i> za ligacijo v pAG25. Sprednji del (5') je restrikcijsko mesto za <i>SaII</i> , zadnji del nalega pred <i>GALpr</i> .	GCGTCGACACTCACTATAGGGCGAAT T
K_GAL_R	Za pomnoževanje kasete <i>GALpr-TST</i> za ligacijo v pAG25. Sprednji del (5') je restrikcijsko mesto za <i>HindIII</i> , zadnji del nalega za <i>TST</i> na pRD53.	GCAAGCTTTCGGAATTAACCCTCACT A
PR_I_ZA_L	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje uspešnosti homologne rekombinacije kasete <i>GALpr-TST-NatMX</i> v lokus <i>MFA1</i> .	TTTTTTCGCCTCGACATCAT
PR_I_ZA_R	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje uspešnosti homologne rekombinacije kasete <i>GALpr-TST-NatMX</i> v lokus <i>MFA1</i> .	GCAGGTACAGGGTATCAAAA
PR_I_PRE D_L	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje uspešnosti homologne rekombinacije kasete <i>GALpr-TST-NatMX</i> v lokus <i>MFA1</i> .	CCGCCAGAAATGAATTAATG
PR_I_PRE _R	Kontrolni za etni oligonukleotid za preverjanje uspešnosti homologne rekombinacije kasete <i>GALpr-TST-NatMX</i> v lokus <i>MFA1</i> .	ATATTCCAGGACAAGAAGGT

*Za etni oligonukleotidi so zapisani v smeri 5' → 3'. Title i konci za etnih oligonukleotidov oziroma deli za homologno rekombinacijo so oznaeni s krepko pisavo, Kozak zaporedje je podrtano, restrikcijska mesta pa izpisana poevno. Proizvajalci za etnih oligonukleotidov: Sigma, Eurofins.

Slika A: Prileganje zaporedij kvasnega proteina Tum1 in njegovih homologov. Od vrha navzdol: Tum1, love-ki hMPST, BosMPST iz *Bos taurus* E.coliMPST iz *E. coli*, LeishMPST iz *Leishmania major* (Qiu in sod., 2012).

