

# EFEKT SYNTÉZY NEUTRÁLNYCH LIPIDOV NA SEKREČIU MASTNÝCH KYSELÍN V *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Peter Seč, Roman Holič**

*Slovenská akadémia vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Biochémia membrán, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko, +421245943151, [peter.sec@savba.sk](mailto:peter.sec@savba.sk)*

## Abstrakt

Kvasinky sú schopné ukladať nespotrebovanú metabolickú energiu do svojich buniek vo forme neutrálnych lipidov, triacylglycerolov (TAG) a sterolesterov (SE). TAG a SE tvoria základ lipidových partikul. Tvorba LP je závislá od štyroch génových produktov: Dga1p, Lro1p, Are1p a Are2p. Voľné mastné kyseliny musia byť pred zapojením do lipidového metabolizmu najskôr aktivované. Za aktiváciu sú zodpovedné acyl-CoA syntetázy (Faa1p, Faa2p, Faa3p a Faa4p), pričom kombinovaná delécia génov pre dve z nich, FAA1 a FAA4, spôsobuje u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sekreciu mastných kyselín (MK). V práci sme sa zamerali na štúdium vzťahu medzi syntézou neutrálnych lipidov a sekrečiou MK u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Účinnosť sekrecie MK sme merali pomocou rôznych analytických metód. Pri našich analýzach sme pozorovali rozdiely v hladinách vysekretovaných MK. Z nameraných výsledkov sme zistili, že sekretujúci kmeň bez LP, sekretuje MK výrazne viac ako sekretujúci kmeň obsahujúci LP.

**KLúčové slová:** sekrecia; neurálne lipidy; mastné kyseliny; lipidové partikuly

## Úvod

Lipidové partikuly zohrávajú významnú úlohu v lipidovom a energetickom metabolizme [1]. LP sa skladajú z hydrofóbného jadra, obsahujúceho neutrálne lipidy, ktoré je ohraničené fosfolipidovou monovrstvou [2].

Prijaté alebo nadprodukované mastné kyseliny (MK) sa v bunke ukladajú v podobe zásobných lipidov, triacylglycerolov (TAG) a sterolesterov (SE), do lipidových partikul (LP) [3,4]. Syntéza LP u kvasiniek je kontrolovaná štyrmi enzýmami, z ktorých dva sa podieľajú na produkcii TAG a dva na produkcii SE [5]. Za tvorbu TAG v LP sú zodpovedné proteínové produkty dvoch génov *LRO1* a *DGA1*. Za syntézu SE sú zodpovedné dve Acyl-CoA sterol acyltransferázy: *Are1p* a *Are2p* [1,6,7]. Kvasinky, ktoré nemajú ani jeden z enzýmov katalyzujúcich tvorbu TAG a SE, netvorí LP a označujú sa ako QM (quadruple mutant). Kvasinka *S. cerevisiae* sekretuje MK do okolitého prostredia, keď sú v nej súčasne deletované gény pre dve acyl-CoA syntetázy (*FAA1* a *FAA4*), ktoré su zodpovedné za aktiváciu prijatých MK z vonkajšieho prostredia [8].

Cieľom našej práce bolo zistiť, aký vplyv majú neutrálne lipidy a ich syntéza na sekrečiu mastných kyselín.

## Materiál a metódy

V experimentoch boli použité nasledovné kmene:

**Tabulka 1:** Názvy použitých kmeňov

<b>BY4742 + YCplac33</b>
<b>BY4742 <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111</b>
<b>BY4742 QM + YCplac111</b>
<b>BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111</b>
<b>BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-<i>DGA1</i></b>
<b>BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-<i>LRO1</i></b>
<b>BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-<i>ARE1</i></b>
<b>BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-<i>ARE2</i></b>

### Spektrofotometrické meranie sekretovaných mastných kyselín do média

Hladiny vysekretovaných mastných kyselín sme merali pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 600nm. V časových intervaloch sme sledovali zákal média testovaných kmeňov, pričom intenzita zakalenia média nám reprezentovala množstvo sekretovaných MK do média.

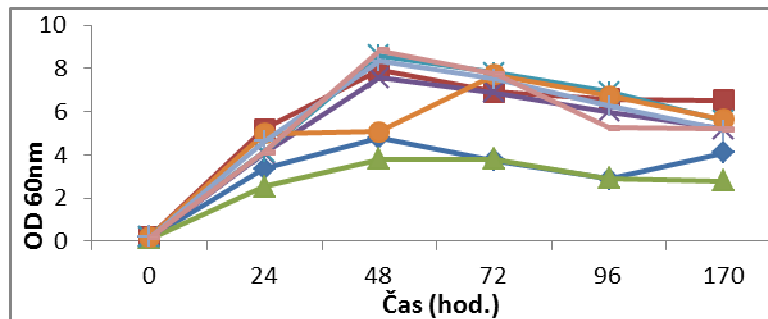
### Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

Lipidy boli odparené dosucha a suspendované v malom objeme zmesi chloroform:metanol 2:1. Na TLC platňu bolo nanesených 50µl pomocou poloautomatického nanášacieho prístroja CAMAG Linomat 5. Lipidy boli delené na TLC platni v dvoch krokoch vyvíjacou zmesou I. (petroléter:dietyléter:kys.octová v pomere 70:30:2) do 3/4 TLC platne a následne vyvíjacou zmesou II. (petroléter:dietyléter v pomere 49:1) po koniec platne. Škvryny lipidov boli vizualizované spálením nasledovne: TLC platňa sa namočila v spaľovacej zmesi a následne inkubovala cca 5 min. pri 130°C v teplovzdušnej sušičke s priebežným kontrolovaním intenzity spálenia. Jednotlivé lipidy boli identifikované porovnaním s pohyblivosťou štandardov.

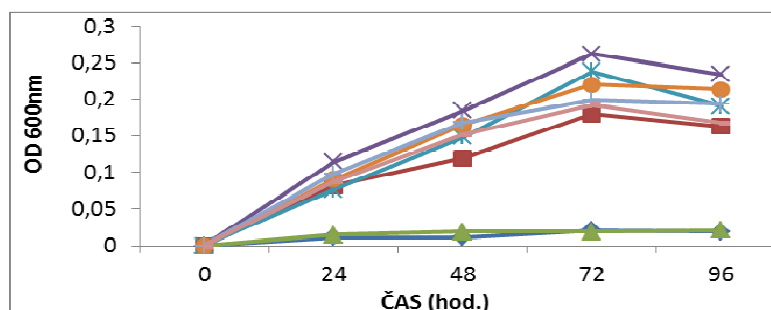
### **Výsledky a diskusia**

Voľné mastné kyseliny sa v bunkách po aktivácii pomocou acyl-CoA syntetáz a syntéze TAG a SE, ukladajú do lipidových partikul v podobe neutrálnych lipidov. Predpokladali sme, že ak bunka nemá možnosť uložiť MK do neutrálnych lipidov a zároveň je schopná sekretovať MK, zvýši sa tak sekrécia MK danou bunkou.

Pomocou spektrofotometrických analýz sme boli schopný sledovať nárast kmeňov (Graf 1) v závislosti od času a hladiny vysekretovaných mastných kyselín formujúcich zákal supernatantu (Graf 2), taktiež v závislosti od času.



**Graf 1** Nárast buniek študovaných kmeňov vyjadrený závislosťou optickej hustoty od času

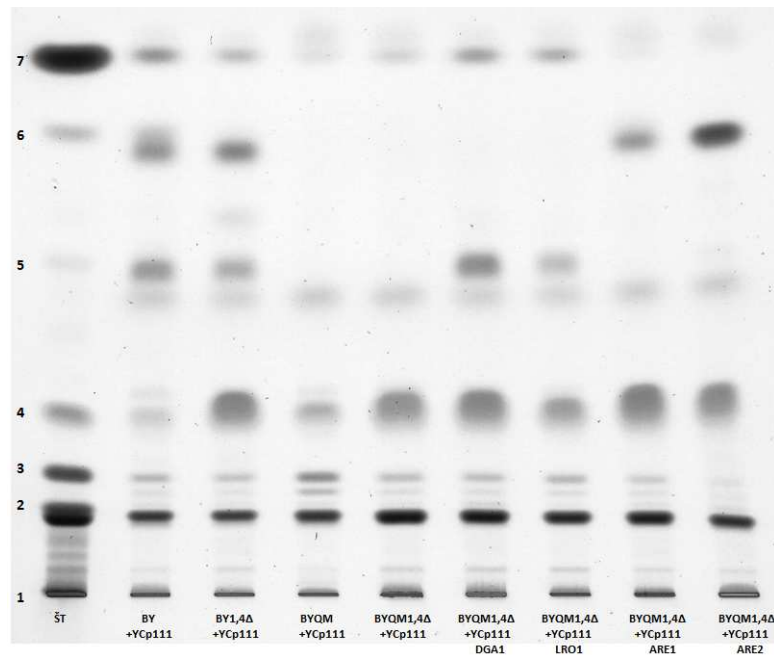


**Graf 2** Meranie hladiny vysekretovaných mastných kyselín do rastového média

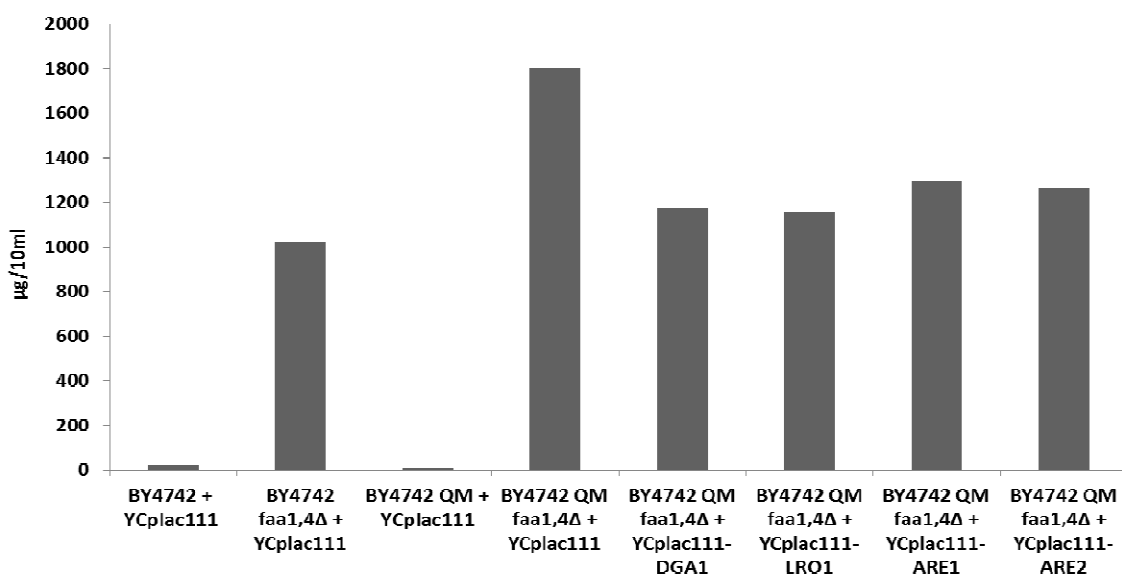
- |   |   |
|---|---|
| ◆ BY4742 + YCplac111                        | ■ BY4742 <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111         |
| ▲ BY4742 QM + YCplac111                     | × BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111      |
| ✱ BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-DGA1 | ● BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-LRO1 |
| ⊕ BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-ARE1 | — BY4742 QM <i>faa1,4Δ</i> + YCplac111-ARE1 |

Výsledky spektrofotometrických meraní zákalu kultivačného média ukazujú, že sekretujúci kmeň bez lipidových partikul (BY4742 QM *faa1,4Δ* + YCp111) v porovnaní so sekretujúcim kmeňom s lipidovými partikulami (BY4742 *faa1,4Δ* + YCp111), dosahuje vyššiu sekréciu MK (graf 2). Zároveň z výsledkov vyplýva, že sekretujúci kmeň bez lipidových partikul, zo všetkých pozorovaných kmeňov, sekretuje MK najvýraznejšie.

Na overenie týchto tvrdení sme analyzovali lipidy aj pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) a plynovej chromatografie (GC) (Obr. 2). Výsledky z TLC nám potvrdili funkčnosť jednotlivých génov syntézy NL. Kmeň s *DGA1*, resp. *LRO1* tvorí TAG avšak nie SE, zatiaľ čo kmeň s *ARE1*, resp. *ARE2*, tvorí SE a netvorí TAG (Obr. 1).



**Obrázok 1** TLC analýza neutrálnych lipidov izolovaných z buniek. Št: 1. Fosfolipidy 2. Ergosterol 3. Lanosterol 4. Voľné MK 5. Triacylglycerol 6. Sterolestery 7. Skvalén



**Obrázok 2** GC analýza metylesterov mastných kyselín extrahovaných z kultivačných médií

## Záver:

Na základe analytických metód sme pozorovali, že sekretujúci kmeň s lipidovými partikulami (BY4742 *faa1,4Δ* + YCp111), sekretuje mastné kyseliny v menších množstvách ako študované sekretujúce kmene. Zároveň sme pozorovali, že sekretujúci kmeň bez lipidových partikul (BY4742 QM *faa1,4Δ* + YCp111) sekretuje mastné kyseliny najvýraznejšie spomedzi študovaných kmeňov. Zo získaných výsledkov vyplýva, že ak kvasinka v dôsledku narušenej syntézy NL neobsahuje LP, nie je schopná ukladať MK do NL a preto sa sekrécia MK zvýrazní. Naopak opätovným vkladným génov zodpovedných za syntézu NL (*DGA1*, *LROI*, *ARE1* alebo *ARE2*), dochádza k tvorbe LP, do ktorých sa MK môžu ukladať a tým sa sekrécia znižuje.

## Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0785-11 a grantom VEGA č. 2/0180/12.

## Literatura

- [1] GUO, Y. Lipid droplets at a glance. *J. of Cell Sci.*, 2009, 122, pp. 749-752.
- [2] BARTZ, R. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.*, 2007, 48, pp. 837-847
- [3] SORGER, D. Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 2002, 184, pp. 519-524
- [4] MEEUX, R.C.R. Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease. *Am. J. Physiol.Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2009, 297, pp. 913-924
- [5] CZABANY, T. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1771, pp. 299-309
- [6] DAHLQVIST, A. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, pp. 6487-6492
- [7] OELKERS, P. A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, pp. 15609-15612
- [8] SCHARNEWSKI, M. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in acyl-CoA synthetases secrete fatty acids due to interrupted fatty acid recycling. *FEBS Jour.*, 2008, 275, pp. 2765-2778

## Abstract

Yeast cells are able to store unused metabolic energy in form of neutral lipids namely triacylglycerols (TAG) and sterolesters (SE). TAG and SE form a core of so called lipid droplets (LD). Formation of LD depends on four gene products: Dga1p, Lro1p, Are1p and Are2p. TAG and SE are also main storage components of free fatty acids. Free fatty acids can be activated and placed into lipid metabolism by four activation genes. It is known, that combined deletion of two fatty acid activation genes, *FAA1* and *FAA4*, causes fatty acid secretion phenotype in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In our work we have studied a relationship between synthesis of neutral lipids and secretion of fatty acids in yeast. Efficiency of fatty acid secretion was measured by several techniques. We demonstrate that mutant with absence of LD secreted higher amounts of fatty acids into growth media compare to control strain. In addition, we have identified differences between amounts of lipids.