

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Toomas Leppik

**Oleiinhappe *cis*- ja *trans*-isomeeride kolesterüülestrite mõju rasva
varundamisele *Caenorhabditis elegans*'is**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Kaja Reisner, Ph.D.

TARTU 2013

Sisukord

LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Rasvade biokeemia.....	5
1.1.1 Rasvade struktuur ja nomenklatuur.....	5
1.1.2 Küllastumata ja polüküllastumata rasvhapped.....	7
1.1.3 Transrasvad.....	8
1.1.4 Kolesterool.....	9
1.1.5 Kolesteriidid.....	11
1.2 Lipiidide metabolism.....	12
1.2.1 Beeta-oksüdatsioon.....	12
1.2.2 Rasvhapete süntees.....	13
1.2.3 Rasvade varundamine <i>C. Elegans</i> is.....	14
1.2.4 Rasvade varundamine <i>C. Elegans</i> is.....	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja meetodika.....	17
2.2.1 <i>C. Elegans</i> 'i kasvatamine.....	17
2.2.2 Vanuse sünkroniseerimine.....	17
2.2.3 Värvimismeetod Oil Red O.....	19
2.2.4 Elueakatse.....	22
2.2.5 Katse varurasva hulga hindamiseks.....	23
2.3 Tulemused.....	23
2.3.1 Eelkatsetused.....	23
2.3.2 Elueakatse.....	23
2.3.3 Rasvavarude hindamine.....	24
2.4 Arutelu.....	27
KOKKUVÕTE.....	29
SUMMARY.....	30
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
LISAD.....	36
1. Foto Oil Red O meetodil värvitud ussist.....	36
2. Elueakatse tulemuste kokkuvõttev tabel.....	36
TÄNUSÕNAD.....	37
LIHTLITSENTS.....	38

LÜHENDID

TFA – transrasvhape, *trans fatty acid*

PUFA – polüküllastumata rasvhape, *poly-unsaturated fatty acid*

MUFA – monoküllastumata rasvhape, *mono-unsaturated fatty acid*

chol – kolesterool

CE – kolesterüülester, *cholesteryl ester* (ehk kolesteriid)

LD – lipiidne tilgake, *lipid droplet*

NGM – nematoodi kasvukeskkond, *Nematode Growth Medium*

LDL – madala tihedusega lipoproteiin, *Low Density Lipoprotein*

HDL – suure tihedusega lipoproteiin *High Density Lipoprotein*

SISSEJUHATUS

Transrasvad on viimastel aastakümnetel jõudnud inimeste toidulauale suuremas hulgas kui varem, seoses peamiselt tehnilikult tahkestatud õlide ja määrdainete kasutamisega. Nende ainete liigse tarbimise tagajärgedeks võivad olla mitmed tõsised terviseprobleemid sealhulgas ka kardiovaskulaarsed haigused. Transrasvade ning nende ühendite tarbimisest tingitud mõjude uurimine ja toimemehanismide kirjeldamine panustab tuleviku tervishoidu.

Ümaruss *Ceanorhabditis elegans*, eesti keeles varbuss, on hea mudelorganism. Kiire kasv, läbipaistev keha ning suhteliselt lihtne kasvatamine laboritingimustes on tema kasutamise eelisteks võrreldes teiste *in vivo* mudelitega. Olulised on biokeemiliste radade sarnasused inimesega mis võimaldavad rakendada meetodikaid uurimaks inimese tervise seisukohalt olulisi valdkondi. *C. elegans*-i on kasutatud mudelina muuhulgas diabeedi, lihaskahjustuse (Gaud et al., 2004), Huntingtoni tõve, Alzheimeri tõve ja Parkinsoni tõve (ülevaade Nass et al., 2002) uurimisel. Seoses mitmete geneetiliste mehanismide evolutsioonilise konserveeritusega kasutab *C. elegans* paljude inimese haigustega seostatud geenide ortolooge. Oleiinhape on levinud monoküllastunud rasvhape ja elaidiinhape on selle trans-isomeer, mida leidub looduses vähem. Ühenduses kolesterooli ning teiste molekulidega on neil rasvhapetel mitmeid funktsioone, lisaks vabaneb rasvhapete oksüdeerimisel palju energiat.

Oma bakalaureusetöö esimeses osas annan ülevaate rasvhapetest ja kolesteroolist ning nende ühendite funktsioonidest *C. elegans*-is ning inimeses. Eksperimentaalselt kirjeldan tehtud laboratoorseid töid. Arutlus seostan oma tulemusi selle uurimisvaldkonnaga laiemalt. Katsed viin läbi nii *fat-3* mutant liiniga kui ka N2 metsiktüüpi ussidega. Kolesterüülestritega keskkonnas kasvanud ussipopulatsioonide kontrollgrupiks on tavalises kasvukeskkonnas elanud populatsioon. Rasvhappe kolesterüülestri ühendid (CE) on triglütseriidide (TAG) kõrval peamisi rasva varu säilitamise viise nii inimesel kui nematoodil (Shaobing et al 2010). Oma töös uurin transrasva mõju *C. elegans*'i elutsükli pikkusele ja vaatlen lipiidivarude hulka. Võrdlen mitme põlvkonna jooksul eridieedil kasvanud ussipopulatsioonide eluiga ja rasvavarusid.

C. elegans-il on lipiididega seotud valdkondade uurimisel mudelorganismina perspektiivi, ka selle töö käigus tõusis esile uusi küsimusi ja tekkis ideid edasisteks katseteks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rasvade biokeemia

1.1.1 Rasvade struktuur ja nomenklatuur

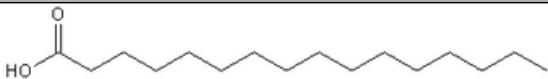
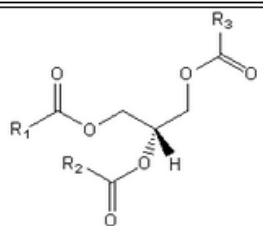
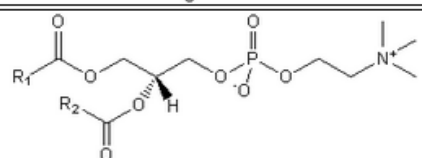
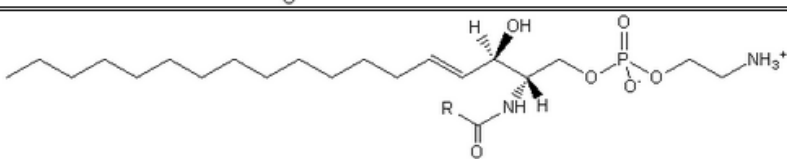
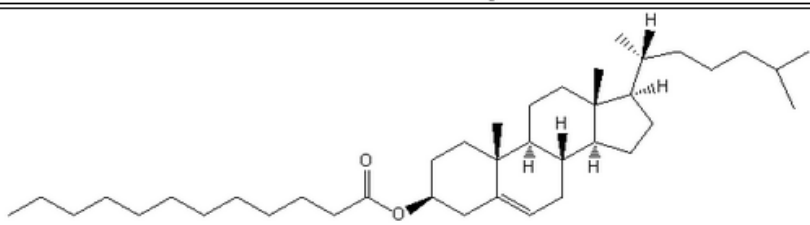
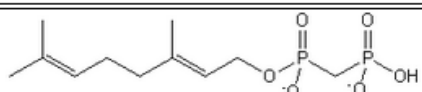
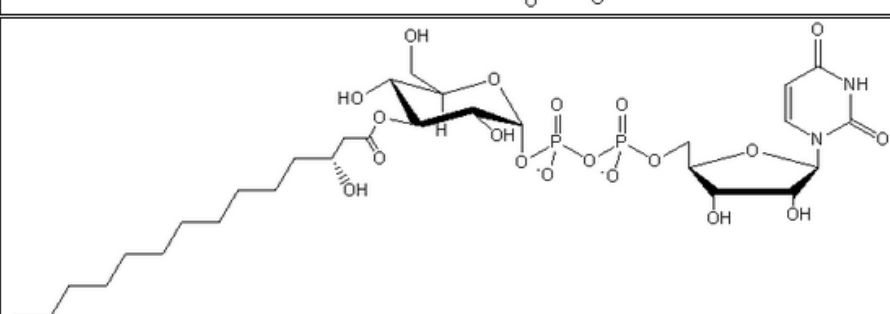
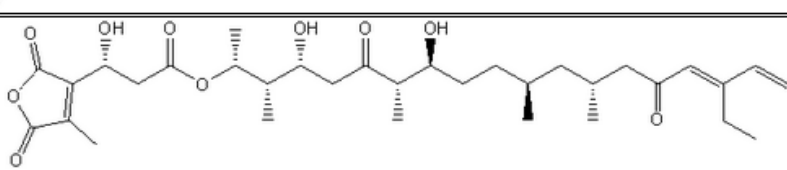
Eukarüootsetes rakkudes on leitud üle kahe tuhande erineva lipiidi. Lipiidid on väikesed bioloogilised molekulid, mis lahustuvad orgaanilistes lahustites nagu kloroform või metanool ja on lahustuvad mõningal määral ka teatud vee-põhistes lahustites. Rasvhapetel on nii hüdrofoobseid kui ka hüdrofiilseid domääne. Valdavalt on tegemist mittepolaarsete molekulidega. Lipiidide klassifitseerimiseks on mitu moodust. Ühe viisina võib jagada lipiidid kaheks: lipiidid, mis on estersidemega ühendatud alkoholiga ning teise grupina rasvlahustuvad vitamiinid (A, E) ja kolesterool. Selline lihtsustatud jaotus põhineb nende molekulide erineval võimel reageerida alustega. Põhjalikuma klassifikatsiooni alusel on lipiidid jaotatud kaheksasse gruppi: rasvhapped, glütserolipiidid, glütserofosfolipiidid, sfingolipiidid, steroolipiidid, prenoolipiidid, sahharolipiidid ja polüketiidid (Tabel 1).

Rasvhapped võivad olla küllastunud, mis tähendab, et nende atsüülahelas puuduvad kaksiksidemed, mono-küllastumata ehk sisaldada üht kaksiksidet või polü-küllastumata sisaldades mitut kaksiksidet. Kaksikside tekitab molekuli painde kuna erinevalt ühekordsest sidemest ei saa ühendatavad osad üksteise suhtes pöörelda. *Cis* sideme puhul on paine suurem, sest ühendatavate süsinike metüülrühmad paiknevad samal pool kaksiksidet. *Trans* sideme puhul on kaksiksideme poolt molekuli tekitatav paine väiksem, sest metüülrühmad paiknevad kaksiksidemest teine teisel pool. Sellest tulenevalt on trans-rasva molekulid tihedamalt üksteise kõrvale pakitavad, see tingib omakorda trans-rasvade suurema tahkuse ja kõrgema sulamistemperatuuri. (1)

Rasvhapete nimetamiseks on mitu moodust. 1) Sümbolitega nime esitamine $x:y (\Delta a,b,c)$ kujul, kus x näitab süsinike arvu, y näitab kaksiksidemete arvu ja tähed ülaindeksis tähistavad kaksiksidemete asukohta alustades lugemist karboksüülrühma süsinikust. 2) IUPAC nomenklatuuri nimi koostatakse kreeka keelsetest lühenditest ja näitab süsinike ja kaksiksidemete arvu. Näiteks linoleenhape on selles süsteemis oktadekadienoonhape, sümbolitega siis vastavalt 18:2 ($\Delta 9,12$) 3) Alternatiivselt sümbolitega nime esitamisele on kasutusel süsteem, mille puhul alustatakse süsinike lugemist distaalsest ahela otsast.

Karboksüülrühma süsinikku tähistatakse α -ga ja viimast süsinikku ω või n-ga. Sellise tähistusega on näiteks arahidoonhape 20:4 (n-6). Siit ka oomega-3 ja oomega-6 nimetuste päritolu. 4) Triviaalnimetustega rasvu nimetades on näiteks 18:1 (n-9) oleiinhape.

Tabel 1: Lipiidide klassifikatsioon Rahvusvahelise Klassifikatsiooni ja Nomenklatuuri Komitee järgi (*International Classification and Nomenclature Committee*)(1)

Rühm	Lühend	Struktuuri näidis
Rasvhapped	FA	
Glütserolipiidid	GL	
Glütserofosfolipiidid	GP	
Sfingolipiidid	SP	
Sterool-lipiidid	ST	
Prenool-lipiidid	PR	
Sahharolipiidid	SL	
Polüketiidid	PK	

1.1.2 Küllastumata ja polüküllastumata rasvhapped

Liikidel kellel on aeglasem ainevahetus on membraanides rohkem monoküllastumata rasvhappeid. Kašeloti traan koosneb valdavalt küllastunud rasvhapetest, selle rasvamassi tihedus muutub sõltuvalt veekihtide temperatuuridest aidates nii kaasa vaala ujuvusele ja kajalokatsioonile (Hulbert ja Else, 2000). *Arabidopsis* muudab oma membraanide lipiidset koostist lähtuvalt temperatuuri muutustest, keskkonna jahenedes suureneb seal tunduvalt 16:0 küllastunud rasvade osakaal (Falcone et al., 2004). Imetajad ja paljud selgrootud peavad toiduga omandama linoolhapet ja α -linoleenhapet mis on neile eluliselt vajalikud, nende defitsiit põhjustab probleeme lipiidsetes signaaliülekanne radades, rakumembraanides ja rikub energia metabolismi. Linoolhape ja α -linoleenhape oksüdeeritakse kiiresti ja neist saadud süsinik paigutatakse suures osas palmithappesse ja kolesterooli, lisaks polüküllastumata rasvhapete (PUFA-de) sünteesile (Gunnane 2003).

Polüküllastumata rasvhapped on imetajate dieedis eluliselt vajalikud kuna neil on ülesehituslik roll membraanides ning oluline osa signaaliülekanne molekulidena. PUFA-d võib jagada omega-3 ja omega-6 rasvhapeteks lähtuvalt kaksiksideme asukohast loendades viimasest metüülrühma süsinikust. PUFA-de metabolismis eelistavad desaturaasid $\Delta 4$ ja $\Delta 6$ ω -3 rasvhappeid ω -6 rasvhapetele kuid toidust saadav ω -6 rasvhapete suur ülekaal 16/1 tingib ω -6 suurema metaboliseerimise. (Hagve ja Christophersen, 1984). Sellest tulenevalt on ω -6 PUFA-de suurt ülekaalu õhtumaises dieedis peetudki mitmete haiguste soodustajaks (ülevaade Simopoulos, 2006).

Imetajatel ja nematoodidel on PUFA-de metabolismis sarnasusi. Erinevusena aga puudub imetajatel delta-12-desaturaas (FAT2), mis katalüüsib oleiinhapest (18:1n-9c) linoolhapet (18:2n-6) sünteesi. Lisaks on nematoodil veel kaks desaturaasi muutmaks omega-6 PUFA-d nende omega-3 analoogideks (omega-3 rasva atsüül desaturaas (FAT-1) ja delta-5 rasvhappe desaturaas (FAT-4). *C. elegans* on PUFA-de prekursoriks oleiinhape. Rasvade aineringe põhialused on evolutsiooniliselt konserveerunud kuid on üllatavaid erinevusi liikide vahel, protsesse katalüüsivad ensüümid on ortoloogsed kuid tsüklid pole siiski identsed .

Desaturaasid loovad rasvhappesse kaksiksidemeid, elongaasid lisavad ahelasse süsinikke. Ahela pikendamine on nelja-astmeline protsess, mis leiab aset mitokondrites ja peroksüsoomides. Ühe pikendamise tsükli tulemuseks on kahe süsiniku võrra pikenenud rasvhape. Ahelasse kaksiksideme lisamist toimetavad ER-i membraaniseoselised ensüümid.

Paljud liigid, sealhulgas ka inimene peavad omandama nii omega-6 kui ka omega-3 rasvhappeid toiduga, nematoodid aga on võimelised neid sünteesima lühema-ahelalistest rasvhapetest.

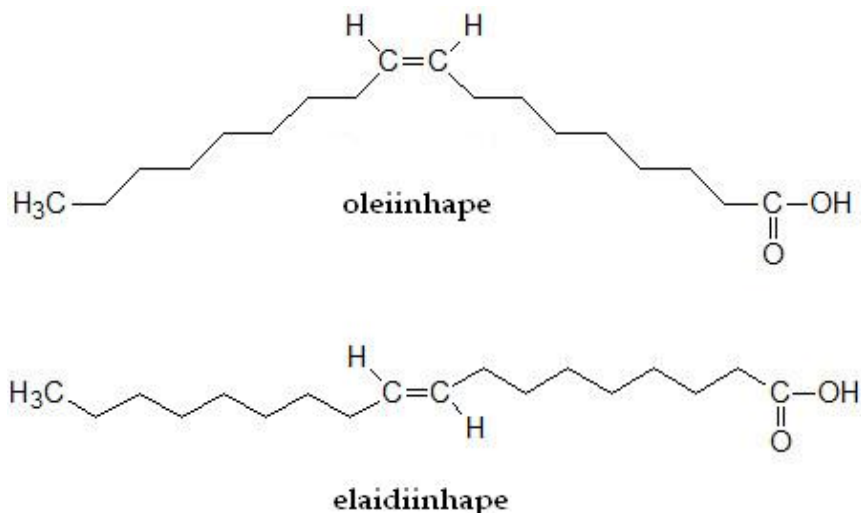
1.1.3 Transrasvad

Transrasvad (TFA) on küllastumata rasvhapete *trans*-isomeerid. Transrasvu leidub looduslikult lihas ja piimatoodetes ja suhteliselt vähesel määral. Looduslikud transrasvad on β -oksüdatsiooni vaheproduktideks, samuti tekivad need bakteriaalsel hüdrogeniseerimisel mäletsejate vatsas (Wilde ja Dawson, 1966). Linoleenhape on polüküllastumata rasvhape, mida esineb rakumembraanide koostises. Linoleenhappest sünteesitakse organismis arahidoonhapet ja ka mõningaid prostaglandiine, seda leidub paljudes taimsetes õlides. Levinumad linoleenhappe *trans*-isomeerid, millel on bioaktiivseid omadusi, on 18:2 (cis-9trans-11) ja 18:2 (trans-10,cis-12) (Rainer and Heiss, 2004). Mõnele linoleenhappe isomeerile on omistatud isegi tervisele kasulikke omadusi kuid selline mõju inimesele vajab veel uurimist (Salas-Salvado et al., 2006). Enamik transrasvu inimese toidulaual on aga tööstuslikku päritolu, peamine mono-küllastumata transrasvast lisandjääk tööstuslikul õlide paksendamisel ehk hüdrogeniseerimisel on oleiinhappe (18:1n-9cis) *trans*-isomeer elaidiinhape (18:1n-9trans). Seda leidub palju margariinides küpsetistes ja teistes tugevalt töödeldud toidusaadustes.

Toiduga omastatavate transrasvhapete kontsentratsiooni on seostatud LDL kolesterooli taseme tõusuga (Katan et al., 1995). Transrasvhapetega seostatakse tüüp kaks diabeeti (Odegaard ja Pereira, 2006), südameveresoonekonna haigusi (Mozzafarian et al., 2006), viljatust (Chavarro et al., 2007) ja mitut tüüpi vähki (ülevaade Thompson et al., 2008). Kuigi terviseuuringud on näidanud toiduga transrasvhapete manustamisega seotud negatiivseid mõjusid (ülevaade Gebauer et al., 2007; Mozzafarian et al., 2009), ei mõisteta veel täpselt nende toimemehanismi molekulaarsel ja raku tasemel.

Transrasvhapped meenutavad kujult küllastunud rasvhappeid, sarnaselt moodustavad needa need toatemperatuuril pehmeid tahkiseid. Kolesterooli ja transrasvade seoste uurimisel on selgunud, et fosfolipiidid mille koostises on TFA-d, on 40-80% affiinsemad membaanseoselise kolesterooli suhtes kui nende cis isomeeridest pärinevad fosfolipiidid (Niu

et al., 2005). Sfingomüelliin ja fosfatidüülkoliin, mis sisaldavad elaidiinhapet, võivad membraanides kolesterooliga ühinedes moodustada korrastunud domääne (Björkbom et al., 2007).

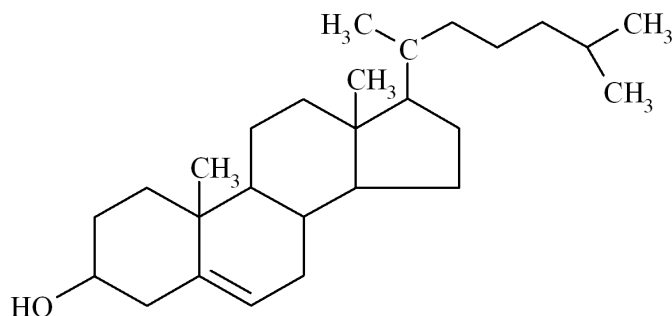


Joonis 1: Oleiinhape (18:1n-9*cis*) ja selle trans isomeer elaidiinhape (18:1n-9*trans*) (4)

1.1.4 Kolesterool

Kolesterool on inimkehas prevaleeriv sterool. Kolesterooli võib nimetada ka lipiidi sarnaseks tsükliiliseks alkoholiks (Zilmer et al. 2006). Kolesterool on biomembraanide strukturealne komponent, sellel on stearaantuim ning see võimaldab tal tahkestada teatud membraani alasid. Kolesterooli omadused ja eelkõige kontsentratsioon mõjutavad ka teiste membraani komponentide paiknemist. Erinevalt teistest lipiididest on kolesterool võimeline kiiresti membraanides end ümber pöörama (Christie 2012), sellest tema olulisus ka signaalide mediaatorina. Kolesterool on üheks koostisosaks vereplasma lipoproteiinides, jagunedes kaheks: suure tihedusega ja väikese tihedusega lipoproteiiniks (HDL ja LDL). Kolesterool on sapphapete ja kõigi steroidhormoonide lähteühend, selle sisaldus on suur kesknärvisüsteemis ja müelliin-kaetud struktuurides. Sapis kaitseb kolesterool membraane sealsete soolade kahjuliku toime eest (Zilmer et al. 2006). Imetajatel toimub kolesterooli süntees maksas,

peensoole limaskestas, munasarjades, testistes ja platsentas ning ajus. Kolesterooli süntees leiab aset tsütoplasmas, see on keerukas protsess, milles on vähemalt kolmkümmend ensümaatilist reaktsiooni (Woodward et al., 1952). Lisaks sünteesile omastatakse kolesterooli ka toidust.



joonis 2: Kolesterool (3)

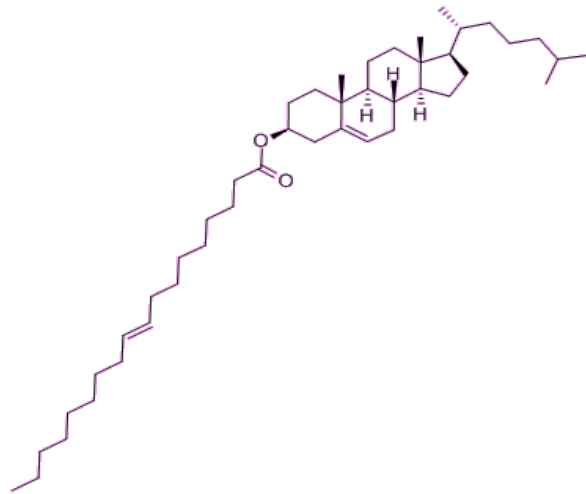
Kolesterool on oluline komponent rakumembraani lipiidsetes saarekestes. Lipiidset saarekesed või membraansed saarekesed (*lipid rafts, membrane rafts*) on steroolide, sfingolipiide ja valkude rikkad väljad rakumembraanides. Need põhinevad valgu ja valgu, ning lipiidi ja valgu vahelistel ühendustel. Membraansete saarekestes on leitud G-valgu seoselisi retseptoreid, retseptor-türosiin-kinaase ja retseptorvalkude signaalikaskaadis osalevaid valke. See viitab membraansete saarekestes rollile signaali ülekandes (ülevaade Patel ja Insel, 2009; Patel et al., 2008). Lisaks kolesteroolile ja sfingolipiidele on näidatud saarekestes ka teisi lipiide ja arahhidoonhapet. Membraanseid saarekesi on peetud ka patogeensete bakterite raku sisenemise piirkonnaks (Vieira et al., 2010)

Tulenevalt kolesterooli mitmekülgsustest funktsioonidest raku tasandil mõjutab see paljusid organismi toimimise seisukohalt olulisi põhiprotsesse. Kolesterool on vajalik paljude G-valgulise retseptori tööks (Fantini ja Barrentes 2009). Membraanides olev kolesterool on väga oluline ionikanalite töö reguleerimisel (ülevaade Maguy et al., 2006; Levitan et al., 2010). Mõju, mida kolesterool ionikanalitele avaldab on erinev, lähtudes kanali tüübist. Enamasti vähendab kolesterool kanali aktiivsust. Teinekord on täheldatud aga hoopis teistsugust mõju - kolesterooli eemaldamine võib mõnel juhul põhjustada kanali inhibeerimist või muuta selle sisse või välja lülitamiseks tarvilikku laengu suurust (ülevaade Levitan et al., 2010). Läbi erinevate signaaliradade, milles kolesterool osaleb võib see avaldada ionikanalitele ka kaudset mõju (ülevaade Levitan et al., 2010).

Nagu kõik nematoodid, ei ole ka *C. elegans* võimeline kolesterooli ise tootma ning peab vajamineva koguse omastama väliskeskkonnast toiduga. Kolesterool on nematoodile oluline kuna osaleb rasvade transpordil ning reguleerib sigimist. Kolesterool pakitakse koos rasvadega LDL-valgu taolitesse partiklitesse ning need omastatakse embrüote poolt retseptor-vahendatud endotsütoosi teel (Fares and Grant, 2002). Fotoaktiivset tehis-sterooli kasutades on tõestatud vitellogeniini roll *C. elegans* kolesterooli transporterina (Matyash et al. 2001). Kolesterooli hulk *C. elegans* on liig tagasihoidlik, et mõjutada oluliselt membraanide struktuuri. Selle aine peamiseks ülesandeks ussis on pakutud steroolil põhinevate hormoonide prekursoriks olemine, need mõjutavad läbi tuumaretseptorite transkriptsiooni (Merris et al., 2003; Entchev ja Kurzchalia, 2005).

1.1.5 Kolesteriidid

Kolesterooli ja estri ühendid ehk kolesteriidid ehk kolesterüül estrid on ühed tähtsamad lipiidid inimkehas, sisaldades enamasti linoolhappejääki või harvemini küllastunud pikaahelalist rasvhappejääki (Zilmer et al., 2006). Plasmas ja eriti just HDL-is sünteesitakse kolesteriide võttes rasvhappe fosatidüülkoliinilt ning lisades selle kolesteroolile külge, katalüsaatoriks sel protsessil letsitiin-kolesterool atsüül transferraas (LCAT). Teistes kudedes sünteesib kolesterüül estreid ensüüm atsüül-CoA:kolesterool atsüültransferaas (ACAT), kasutades selleks rasvhapete CoA estreid ja kolesterooli. ACAT ensüümil on kaks vormi, mõlemad on rakusisesed ja tegutsevad endoplasmaatilises retiikulumis. Sarnaseid ensüüme võib leida pärmis.



Joonis 3. Elaidiinkolesteriid (6)

Kolesteriidid on vähem polaarsed kui vaba kolesterool ning seetõttu on nad plasmas heaks transpordivahendiks mitmetele molekulidele. Nende inertsetest omadustest tulenevalt kasutab organism kolesterüül-estrid detoksifikatsioonil kahjulike ainete ladustamisel. Plasma kolesteriidid sisaldavad suures mahus polüküllastumata rasvhappeid. Arahidoonhapet 20:4(n-6) võib olla eriti rohkesti neerupealiste kolesterüülestrites.

Kolesterüülestrite komponentideks jagamine toimub inimesel lüsoosoomides. On näidatud, et oleiinhappe kolesterüülestritest lüsoosomaalselt eraldatud rasvhapped kasutatakse kehas sarnaselt eksogeenselt lisatud oleiinhappega. Hoolimata päritolust paigutatakse oleiinhapet triatsüülglütserooli ja mitmetesse fosfolipiididesse (Groener et al., 1996). Inimese geen CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) kodeerib kolesterüülestrite transport valku.

1.2 Lipiidide metabolism

1.2.1 Beeta-oksüdatsioon

Nii imetajates kui *C. elegansi's* toimub beeta-oksüdatsioon kahtedes organelides - mitokondrites ja peroksüsoomides. Beeta-oksüdatsioon on tsükliline protsess, mis on vajalik, et hakata kasutama rasvadesse kätketud energiat. Triatsüülglütseroolid viiakse lipoproteiinide poolt kudedesse, hüdrolaasid vabastavad seejärel rasvhappe glütseroolist. Tsütosoolis rasvhape aktiveeritakse, see võtab kahe ATP jagu energiat. Aktiveeritud rasvhapped on

ühenduses atsüül-CoA-ga. Enamik aktiveeritud rasvhappeid toimetatakse karnitiini abil mitokondrisse beeta-oksüdatsiooniks, väike osa neist, pikaahelalised RH-d, aga viiakse peroksüsoomidesse kus toimub nende eelnev lühendamine, et mitokondriaalne β -oksüdatsioon saaks hiljem lõpuni kulgeda. Mitokondriaalse β -oksüdatsiooni üks tsükkel eemaldab ahelast kaks süsinikku. Atsüül-CoA dehüdrogenaas katalüüsib atsüülrühma oksüdatsiooni, tekitades kaksiksideme 2. ja 3. süsiniku vahele. Kaks vabanenud elektroni liituvad FAD subühikuga mis annab need omakorda edasi ubikinoonile. Enoüül-CoA hüdrotaas lisab kaksiksideme kohale veemolekuli. 3-Hüdroksüatsüül-CoA katalüüsib hüdroksüatsüül rühma oksüdatsiooni, kofaktor NAD juuresolekul. Kaks elektroni liituvad NAD-ile ja tekib NADH+H⁺. Seejärel vabastab tiolaas atsetüül-CoA ketoatsüül-CoA küljest. Ühe β -oksüdatsiooni tsükli saagis on : QH (millest saab 2 ATP-d), NADH+H⁺ (saab 3 ATP-d), viimasest oksüdatsiooni ringist tekib ka atsüül-CoA. Atsüül-CoA läbib tsitraadi tsükli, mille tulemusena saadakse 3 NADH+H⁺-d, QH ja GTP (saab 1 ATP). Mõlema protsessi produktid läbivad oksüdatiivse fosforüleerimise, mille kogu saagis on 17 ATP-d. Kui sellest lahutada aktivatsiooniks kulunud kaks ATP-d on bilanss 15. Palmithape näiteks, mille ahelas on 16 süsinikku, läbib β -oksüdatsiooni ringi 7 korda, millest kokku saab 129 ATP-d. (7)

Erinev süsinike arv ja kaksiksidemete olemasolu ning nende konformatsioon, mõjutavad β -oksüdatsiooni kulgu ning ATP saagist. *Cis*-kaksikside on takistuseks atsüül-CoA-le, see muudetakse *trans*-kaksiksidemeks ja protsess saab jätkuda, sellisel juhul, tekib 2 ATP-d vähem kuna ära jääb ubikinooni redutseerimine. Mõnedel taimsetel ja bakteri rasvadel on ahelas paaritu arv süsinikke, sellisel juhul ei ole lõpp-produktiks mitte atsetüül-CoA vaid propionüül CoA, millest saadakse 12 asemel 8 ATP-d.

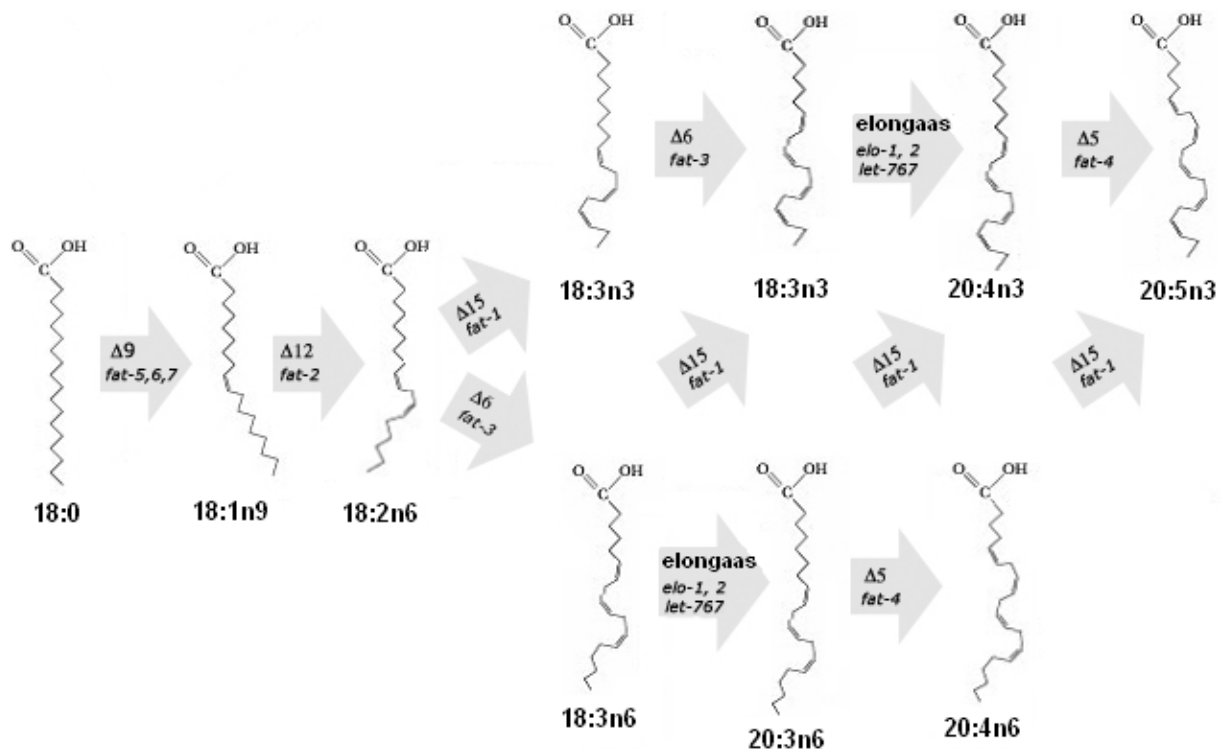
C. elegansi beeta oksüdatsiooni kontrollivad imetajate vastavate geenide ortoloogid. Tegemist on evolutsiooniliselt konserveerunud mehhanismiga. Põhistruktuur on praktiliselt sama, kõigepealt rasvhape eraldatakse, seejärel aktiveeritakse, siis oksüdeeritakse ning peale seda lisab MAOC-1 / hüdrotaas kaksiksidemele vee molekuli. DHS 28 / dehüdrogenaasi katalüüsitud reaktsiooni järel eraldab DAF-22 kodeeritud tiolaas atsetüül-CoA. (ülevaade Zhang et al., 2010)

1.2.2 Rasvhapete süntees

Rasvhapete biosüntees algab atsetüül-koensüüm A karboksülaasiga (ACC), mis on katalüsaatoriks atsetüül-CoA ATP-sõltuvalt karboksüleerimisele moodustamaks malonüül-CoA. Malonüül-CoA-d kasutatakse seejärel kahe süsinikuliste algosade doonorina rasvhapete *de novo* sünteesiks rasvhappe süntetaasi (FAS) poolt. FAS on multifunktsionaalne valk mis koosneb seitsmest katalüütilisest domeenist. See ensüüm koostab rasvhappeid viies läbi järjestikkusi kondensatsiooni reaktsioone malonüül-CoA-ga, millede tulemuseks on palmitoüül-CoA (16:0) Inimesel on FAS-i peaaegu kõigis kudedes. (Vrablik ja Watts 2012)

C. elegans kodeerivad fat-6 ja fat-7 geenid SCD-sid ja sarnane, fat-5 kodeerib palmitool-CoA desaturaasi, D9. Küllastumata rasvhapete sünteesi rada algab *C. elegans* palmithappena (16:0), mida saadakse toidust - *Escherichia Coli*-st, või on see sünteesitud. D9 desaturaas konverteerib palmithappe palmitoolhappeks (16:1). Palmitoolhape muudetakse seejärel süsinike lisamisega *cis*-vaktseenhappeks (18:1), mis on enimesinev rasvhape fosfolipiidides ja triglütseriidides. Palmithapet (16:0) muudetakse ka veel steearhappeks (18:0), mis on substraadiks FAT-6-le ja FAT-7-le desatureerimaks sellest edasi oleiinhapet (18:1). Oleiinhapet desatureerides ja elongeerides saab sünteesida kõiki polü-küllastumata rasvhappeid (PUFA-sid), kaasa arvatud arahhidoonhapet (20:4n-6) ja eikosapentaenoonhapet (20:5n-3) (Watts ja Browse 2002). Desaturaaside hulka, mida on tarvis D9 järgselt PUFA-de sünteesiks kuuluvad FAT-2 (D12 desaturaas), FAT-3 (D6 desaturaas), FAT-4 (D5 desaturaas), ja FAT-1 (omega-3 desaturaas). (Brock et al., 2007)

Normaalse metsik-tüüpi ussi paljud erinevad koed sisaldavad 20C rasvhappeid (Watts et al. 2002). Oma töös kasutan *fat-3* (ok1126) 1,2 Kbp deletsiooni mutanti. Joonisel 1 on näha FAT-3 ensüümi paiknemine rasvhapete sünteesi ahelas. Kui kõnealune geen välja lülitada, siis on pikkade rasvhapete süntees pidurdatud. *Fat-3* geen kodeerib D6 desaturaasi ja ekspresseerub praktiliselt kogu ussi kehas. D6 desaturaas on rasvhapete metabolismis *C. elegans* olulisel kohal, tehes linoleenhapest gamma-linoleenhapet (18:3n-6) ja alfa-linoleenhapest stearidoonhapet (18:4n-3). Nimetatud ained on vajalikud pikemaahelaliste rasvhapete edasiseks sünteesiks.



Joonis 4: Rasvhapete süntees *C. elegans*

1.2.3 Rasvade varundamine *C. Elegans*

C. elegans-is on 78% küllastumata rasvhappeid ja 22% küllastunud rasvhappeid, küllastumata rasvhapetest moodustavad valdava enamuse 18:1 monoküllastunud rasvhapped (Reisner et al., 2011). Küllastunud ja küllastumata rasvhapete suhe on oluline, seda seostatakse membraani läbivate kanalite funktsioneerimisega lipiidsete membraani saarekete koostises (Niu et al. 2005). Erinevalt imetajatest puuduvad *C. elegans*il spetsiaalsed rasvarakud. Valdavad rasvade ladustamise organellid ussis on lipiidide tilgakesed LD (ingl.k. *Lipid droplets*). Neid organelle katab ühekordne lipiidkiht, milles asuvad transportvalgud. Sisaldises triglütseriidid ülekaalus kolesterüül estrite suhtes. Tilgakeste suurust ja sisulist koostist mõjutavad pinda katvate valkude koosseis ja metaboolsed rajad (Zhang et. al. 2010). Lipiidsete tilkade moodustumise ja kasutamise uurimine panustab diabeedi ja rasvumise ravi-

ja ennetusmeetoditesse. Eelnevalt on katseliselt näidatud, et dieedi eripärad põhjustavad muutusi lipiidsete tilgakeste suuruses ja hulgas. S. O. Zhang kolleegidega näitas 2010 aastal, et vaktseenhappe (C18:1n7) ülekülluses kasvanud ussidel on rohkem rasvavaru.

LD-del on oluline osa lipiidide sünteesil, rakendamisel ja transpordil. LD-sid on seostatud ka mitmete oluliste rakuliste protsesside toimumiskohana, mis ei pruugigi olla seotud otseselt rasvade metabolismiga. Nende levik ei ole piiratud adipotsüütidega vaid LD-d on väga levinud erinevates eukarüootsetes ja prokarüootsetes rakkudes. Lisaks metabolismi häiretega seotud haigustele nagu steatoos ja ateroskleroos on lipiidsete tilgakestega uuritavate haiguste juurde lisandunud ka neuropaatia ja kardiomiopaatia ning veel mõned haigused, mis ei tundu olevat seotud otseselt rasvadega. (Suzuki et al 2011)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Võrrelda metsiktüüpi (N2) loomas ja *fat-3* (ok1126) mutandis Oleiinhappe *cis*- ja *trans*-isomeeride kolesterüülestrite mõju ussi elueale ja rasvavarude hulgale. Võrrelda erinevaid põlvkondi varurasva hulga osas.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 *C. Elegansi* kasvatamine

Laboris hoitakse *C. elegansi* NGM-il (nematode growth medium – nematoodi kasvukeskkond) Petri tassidel. NGM-il on kindel koostis – 3g NaCl, 17g agarit, 2,5g baktopeptooni, 1ml 1M MgSO₄, 25ml 1M K(PO₄)₃, 1ml 1M CaCl₂ ja 1ml kolesterooli lahust (5g kolesterooli 1l etanoolis) ühe liitri vee kohta. Toiduna kasutatakse *Escherichia coli* OP50 liini, mis on auksotroofne uratsiili suhtes. See võimaldab piirata bakterikasvu NGM-plaatidel.

Kasutasin kolme tüüpi kasvukeskkonda: tavaline NGM, 75 µM elaidiinkolesterüül-estriiga NGM ja 75 µM oleiin kolesterüül ester, kuhu Kolesteriidide lisamiseks tuleb need eelnevalt sulatada. Kasvatasin N2 metsiktüüpi ja *fat-3* (ok1126) mutantliini 20°C juures.

2.2.2 Vanuse sünkroniseerimine

Viies läbi katseid *C. elegans*'iga on tihti tarvis tagada usside grupi ühtne vanus, sellel puhul kasutatakse sünkroniseerimist. Ühel Petri tassil kasvavat populatsiooni kasvatatakse

staadiumini, kus munemine on jõudnud maksimumini. Seejärel viiakse vaid munad üle teisele plaadile. See tagab järgneva põlvkonna küllaltki ühtse vanuse.

Protseduur:

Järgneva protseduuri tegevused on enamuses soovitatav läbi viia mikroskoobi all, et vältida suurt munade kadu.

1. Kui ussid on piisavalt munenud (vähemalt paarsada muna) pesta kogu populatsioon Petri tassilt maha 1 ml H₂O-ga ning viia 1,5 ml Eppendorfi tuubi.
2. Tsentrifugida ussid ja munad põhja 1 min jooksul 2000 rpm juures .
3. Eemaldada supernatant ja lisada sünkroniseerimislahus. Jätta segu toatemperatuurile maksimaalselt 6 minutiks, seda aegajalt intensiivselt loksutades. Loksutamiseks võib kasutada iga paari minuti tagant umbes 10 sekundit vortexit.
4. Aeg-ajalt kontrollida mikroskoobi all läbi tuubi seina, kas ussid on lahustunud. Niipea kui on näha, et ussid on lahustunud või on lisaks munadele alles veel vaid üksikud katkised ussi kestad, tuleb munad põhja tsentrifugida 1 minuti jooksul kiirusega 2100 rpm.

Kui selles etapis jäävad munad liiga kauaks sünkroniseerimislahusesse võivad need kahjustuda ja hiljem mitte kooruda.

5. Eemaldada supernatant ning pesta 3-4 korda 1xPBS puhvriga.
6. Eemaldada supernatant jättes tuubi 50-100 µl vedelikku.
7. Pipeteerida munad uuele söötmele, eelnevalt tuubis paar korda pipetiga suspendeerides, vältimaks suuremaid kadusid ja munade liigset aggregerumist.

Sünkroniseerimislahuse retsept 1 ml jaoks:

1. 700 µl H₂O
2. 200 µl Cl-hüperoksiid (Sobib ACE majapidamisvalgendi.)

3. 100 µl NaOH 5N

2.2.3 Värvimismeetod Oil Red O

Rasvavarude paiknemise ja mahu määramiseks on hea meetod rasvade värvimine. Elusatele ussidele manustatavate värvide nagu Nile Red ja BODIPY miinusena võib tuua, et need värvivad ka happelisemaid raku osiseid, lüesosüümiga seotud organelle. Nii saadud tulemused ei pruugi täielikult ühtida varurasva tegeliku mahu ja paiknemisega (Rourke et al. 2009). Lähtuvalt vajadusest värvida vaid rasva, tuleb eelistada fikseeritud usside värvimist ning kasutada selleks Oil red O meetodit. Erinevalt teistest meetoditest on sellega võimalik muuta nähtavaks ka gonaadis ja munades paiknev rasv ning värvub ka hüpoderm (Rourke et al. 2009).

Oil red O värvimist kasutatakse rasva varude hindamiseks *C. elegans*'s. Algne protokoll pärineb Ashrafi Laboratooriumist California Ülikoolist San Franciscos. Minu töös kasutamiseks on sisse viidud muudatused lähtuvalt. Paraformaldehüüd on asendatud formaldehüüdiga ja spermiin on jäetud kasutamata. Agarooši asemel kasutan slaidide valmistamisel Mowiol'i, millel on paremad optilised omadused, lisaks selline slaid ei kuiva ning säilib palju kauem vaadeldavana.

Oil Red O värvimismeetodi puhul on oluline fikseerida ussid nõnda, et füsioloogiliselt ei tekiks neile kahjustusi. Selleks kasutatakse 2xMRWB lahust (*Modified Ruvkun's Witches Brew*). Samas tuleb ussi kutiikul muuta värvilahust läbilaskvaks, selleks on MRWB's beeta-merkaptotoetanool ja reduktsioonipuhvril DTT, mis lõhuvad kutiikulit kooshoidvaid disulfiidseid sidemeid.

Materjalid:

1. 20% formaldehüüd
2. Na₂EGTA,
3. Spermidine 3HCl, (Sigma, kataloogi number: 85578, 1 g)
4. NaPIPES pH 7.4,
5. Beta-ME
6. Oil Red O (Sigma, kataloogi number: O0625)
7. Isopropanool
8. DTT
9. Filter 0.2 µM
10. Tris puhverlahus
11. HCl
12. PBS
13. Mowiol
14. NaCl
15. KCl
16. Na₂HPO₄·7H₂O
17. KH₂PO₄
18. NaOH

Protseduur:

1. Koguda soovitud vanuses ussid 1,5ml Ependorfi tuubi, kasutades 1x PBS puhvrit. Tsentrifugeerida ussid tuubi põhja 1min jooksul 2100 rpm juures. Oluline on töötada piisava hulga ussidega kuna protsessi jooksul läheb neid kaduma.
2. Aspireerida supernatant ja pesta uuesti 1xPBS puhvriga. Tsentrifugeerida ussid põhja nagu esimeses etapis.
3. Peale teist pesemist jätta tuubi 400 µl supernatanti.
4. Fikseerimine. Lisada 500 µl 2x MRWB (värske) ja 100 µl 20% formaldehüüdi. Jätta toatemperatuurile 30min fikseeruma segades õrnalt, pöörates tuubi minutis 5-8 korda minutis.

5. Pesta kaks korda 1ml Tris puhvriga [100mM pH 7,4]. Pesukordade vahel tsentrifuugida ussid põhja 1min jooksul 2100 rpm juures.
6. Peale teist pesukorda jätta tuubi 100 µl supernatanti. Lisada 900 µl reduktsiooni puhvrit [100 mM Tris-Cl pH 7.4, 10 mM DTT (1.54 mg in 1 ml)]. Jätta 30 min toatemperatuurile segades õrnalt, pöörates tuubi 5-8 korda minutis .
7. Tsentriuuugida ussid põhja 1min jooksul 2100 rpm juures.
8. Pesta 500 µl 1x PBS puhvriga; Tsentrifuugida ussid põhja 1min jooksul 2100 rpm juures.
9. Jätta tuubi 300 µl vedelikku, lisada 700 µl isopropanooli. Jätta 15 min toatemperatuurile segades õrnalt, pöörates tuubi 5-8 korda minutis .
10. Koguda ussid tuubi põhja tsentrifuugides 2100 rpm juures 1 min.
11. Eemaldada kogu isopropanool ja lisada Oil Red O värvilahus.
12. Oil Red O värvilahuse ettevalmistamine:
Lisada 0,5g Oil Red O-d 100 ml isopropanoolile, segada 2 päeva toatemperatuuril.
13. Umbes 15 minutit enne kasutamist segada 4 osa vett ja 6 osa värvilahust ja jätta 15 min toatemperatuurile. Lahus on hägune.
14. Filtreerida lahus 0.2 µM poori läbimõõduga filtrit kasutades. Filtraat peaks olema selge.
15. Lisada 1ml filtreeritud 60% lahust ussidele. Jätta üle-öö toatemperatuurile segades õrnalt, pöörates tuubi 5-8 korda minutis.
16. Koguda ussid tsentrifuugides 1200 g juures 1min.
17. Eemaldada nii palju värvilahust kui võimalik ja pesta üks kord 1xPBS puhvriga.
18. Jätta tuubi 30- 70 µl vedelikku lähtuvalt vajadusest. Suure koguse usside korral ei ole minimaalne võimalik vedeliku hulk otstarbekas kuna nii kipuvad ussid jääma agregaatidesse ja nende individuaalne vaatlemine võib olla kohati raskendatud.
19. Slaidi tegemine:
Alusklaasile pipeteerida tilk geeliat Mowiol'i (40-60 µl)
Mowiol'ile pipeteerida värvitud ussid kasutades Pasteur'i pipetti.
Katta katteklaasiga.

Retseptid:

2XMRWB:

160 mM KCl,

40 mM NaCl,

14 mM Na₂EGTA,

1 mM Spermidine HCl,

0.4 mM Spermine,

30 mM NaPIPES pH 7.4,

0.2% beta-ME

Reduksioonipuhver:

100 mM Tris-Cl pH 7.4

10 mM DTT

H₂O – ülejäänud mahus

2.2.4 Elueakatse

Usse kasvatati 7 põlvkonda kolmel erineval söötmel. Usside elutsükkel on suhteliselt kiire, munemise maksimumini jõuab uss 96 tunniga (20C° juures), seega F7 põlvkonnani jõudmiseks kulub umbes üks kuu. Ühel grupil oli keskkond EA-CE (*trans*) 75µM ja teisel grupil OA-CE (*cis*) 75µM ja kontrollgrupp tavalisel NGM-il. *Fat-3* (ok1126) mutandi L4 staadiumis vastsed viidi Petri tassidele. Ühe katsegrupi suurus oli 20 ussi, kes kasvasid ühel Petri tassil. Ussid kanti uuele plaadile iga paari päeva tagant, katse esimesel viiel päeval iga päev. Katse viidi läbi 20 C° juures. Elumärke kontrolliti peene karvaga looma nina ja saba puudutades, elus uss reageerib sellisele puudutusele.

2.2.5 Katse varurasva hulga hindamiseks

N2 metsik tüüpi ja *fat-3* (ok1126) mutanti kasvatati kumbagi kolmes erinevas keskkonnas. OA-CE 75 μ M EA-CE 75 μ M keskkonnas ja kontrolliks tavalisel NGM-il. F2 ja F7 põlvkonna noore täiskasvanu staadiumis usside populatsioonid fikseeriti ja värviti Oil Red O meetodil.

Värvitud usse pildistati 20x suurendusega, igast grupist 20 isendit. Saadud 200 fotot analüüsiti tarkvaraga Olympus CellSens. Värvunud rasvana arvestatav toonide vahemik seadistati. Ussi kujutis igal pildil eraldi piiritleti manuaalselt ja ning programm leidis selle pindala. Tarkvara mõõtis värvunud pindala ja arvutas kui suure protsendi moodustab see kogu ussi kujutise pindalast ning esitas kokkuvõtvad andmed katsegruppide kohta.

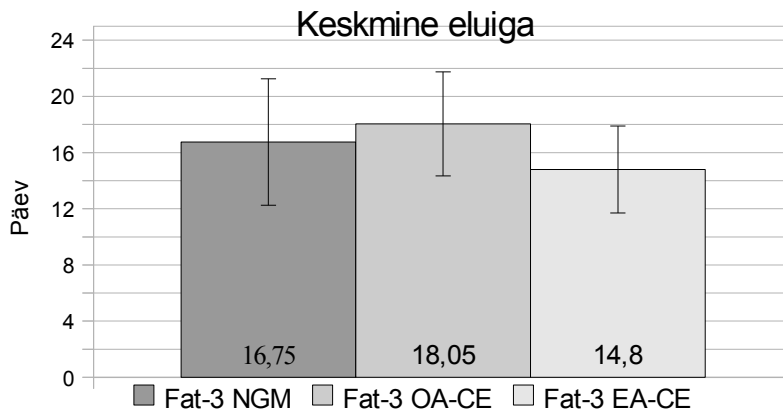
2.3 Tulemused

2.3.1 Eelkatsetused

Eksperimente ettevalmistades kasvasin usse 75 μ M EA, OA kolesterüülestritega rikastatud NGM-il kuhu ei olnud lisatud kolesterooli. Teine põlvkond oli märgatavalt vähem elujõuline ning nende järglaskond liiga kesine. Sellest lähtudes otsustasin edasistes katsetes kasutada NGM-i mis sisaldab alati ka standardse komponendina ettenähtud kolesterooli kogust.

2.3.2 Elueakatse

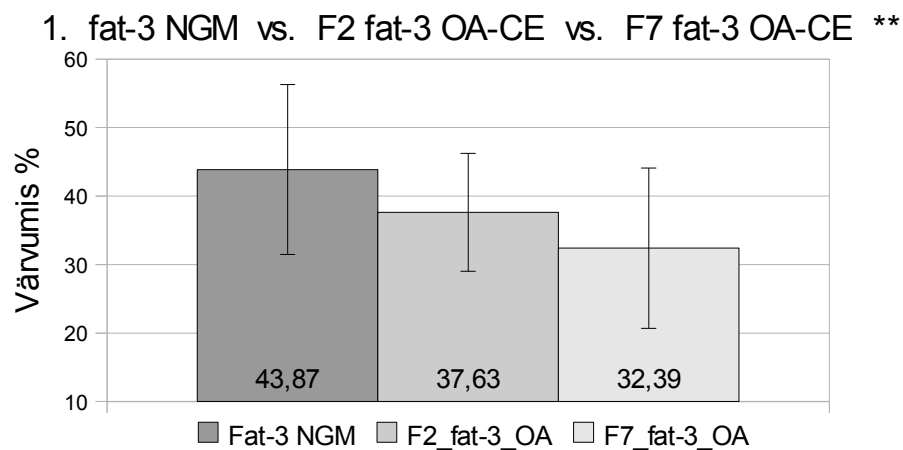
T-test (two tailed T-test, assuming unequal variances) näitas, et katsegruppide keskmised vanused pole statistiliselt erinevad. Statistiliseks analüüsiks kasutati Microsoft Exceli tarkvara Joonisel 5 on kujutatud katsegruppide keskmised vanused, püstlõiguga standardhälve. Tabelis 2 (Lisad) on toodud kokkuvõtvad andmed.



Joonis 5: Keskmine eluiga

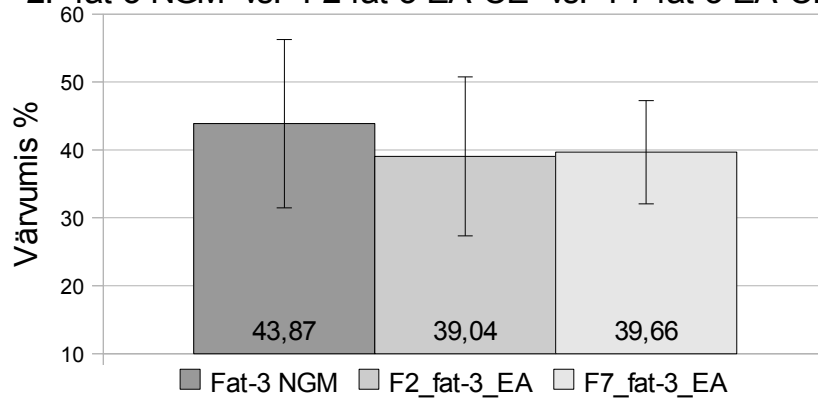
2.3.3 Rasvavaru hindamine

Värvitud usside fotosid (Lisad 1.) analüüsiti programmiga CellSens (two tailed T-test) ja p väärtuste arvutamiseks kasutati QuickCalcs (5) tarkvara. Joonistel 5a ja 5b kujutatud diagrammidel on tulpades toodud katsegruppide keskmine värvumis protsent, horisontaal lõiguga on kujutatud standard hälve. ** Grupi nime järel viitab statistiliselt olulisele erinevusele $p < 0,05$ võrreldes esimeses tulbas kujutatava kontrollgrupiga. Tabelis 1, on kokkuvõtvalt esitatud keskmised väärtused, standard hälbed ja olulisemad p väärtused.

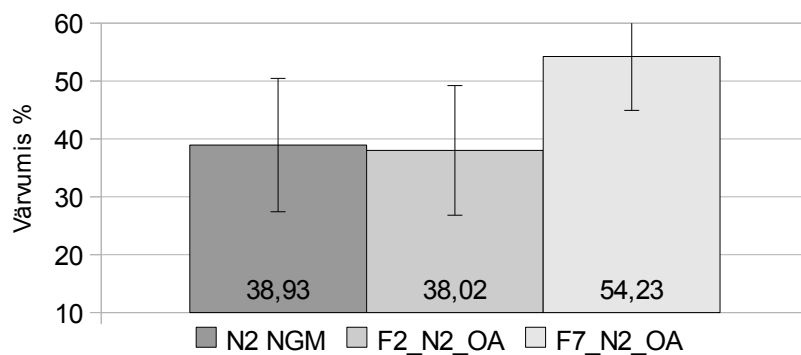


Joonis 5 a: Populatsioonide keskmine värvumus

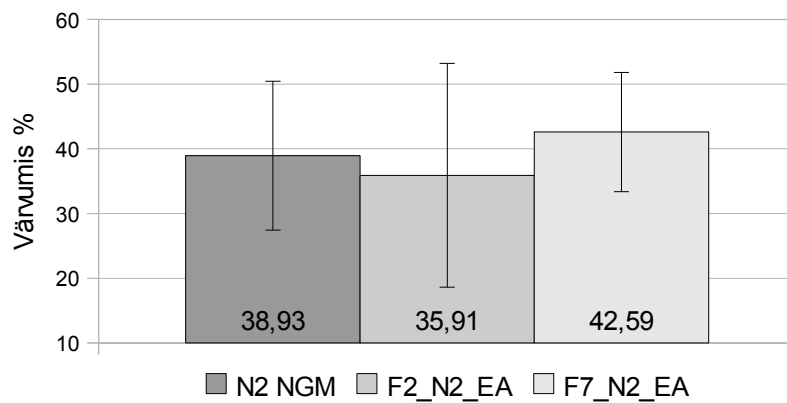
2. fat-3 NGM vs. F2 fat-3 EA-CE vs. F7 fat-3 EA-CE



3. N2 NGM vs. F2 N2 OA-CE vs. F7 N2 OA-CE **



4. N2 NGM vs. F2 N2 EA-CE vs. F7 N2 EA-CE



Joonis 5b: Populatsioonide keskmine värvumus

Tabel 3: Rasvavaru hindamise kokkuvõtvad tulemused

	NGM	
	N2 NGM	Fat-3 NGM
Keskmine	38,93	43,87
Standard hälve	11,49	12,39
Olulised p väärtused		

	F2			
	F2_N2_EA	F2_N2_OA	F2_fat-3_EA	F2_fat-3_OA
Keskmine	35,91	38,02	39,04	37,63
Standard hälve	17,28	11,17	11,66	8,6
Olulised p väärtused				

	F7			
	F7_N2_EA	F7_N2_OA	F7_fat-3_EA	F7_fat-3_OA
Keskmine	42,59	54,23	39,66	32,39
Standard hälve	9,19	9,25	7,58	9,3
Olulised p väärtused		0,0001		0,002

2.4 Arutelu

Transrasva teistsugused omadused võrreldes *cis*-isomeeridega mõjutavad rakkude funktsioneerimist. Oleiinhape on prekursoriks edasisele pikaahelaliste rasvhapete sünteesile (joonis 4) - kas *trans*-isomeeri lisamine substraatide hulka võib mõjutada edasist pikaahelaliste rasvhapete sünteesi? Kuidas mõjutab transrasv rasvavarusid? Algse hüpoteesi kohaselt oleks võinud minu katsetes elaidiin (*trans*) kolesterüülestri keskkonnas näha *fat-3* (ok1126) liinil lühenenud eluiga (Reisner et al., 2011), tulemused olid aga teistsugused. Elueakatse ei näidanud elaidiin-kolesterüülestri ega oleiin-kolesterüülestri keskkondades kasvanud populatsioonide eluea erinevust võrreldes tavalisel NGM-il kasvanud kontrollgrupiga.

Miks kasutasin oma tööks just *fat-3* (ok1126) mutanti? *Fat-3* (ok1126) fenotüübilisteks defektideks on natuke aeglasem kasv ja väiksem keha, vähiksemaarvulisem järglaskond (Watts et al., 2002). Tegemist on funktsionaalsete häiretega, mida on võimalik leevendada lisades söötmesse polü-küllastumata rasvhappeid (Brock et al. 2007). *Fat-2* mutandid ei ole katsete läbiviimiseks piisavalt elujõulised. Hindamaks dieediga manustatavate rasvhapete mõju, on *fat-3* (ok1126) mutant sobiv kuna pikkade PUFA-de süntees on peatatud (joonis 4).

Eelkatsetuste proovisin kasvatada usse keskkonnas, kuhu ei olnud lisatud vaba kolesterooli. Kasutatud kolesterüül estrite koostises oli kolesterooli ~60%, mis annab kasvukeskkonna kogu kolesterooli kontsentratsiooniks 45µM (tavaline NGM 13µM). Siiski ei suutnud ussid mitut põlvkonda järjest sellises keskkonnas elujõulisust säilitada. Need tähelepanekud viitavad sellele, et uss ei suuda kasutada piisaval määral kolesterüülestrites olevat kolesterooli.

Rasvavarude hindamiskatse näitas, et *fat-3* (ok1126) mutandi rasvavaru on väiksem oleiin kolesterüülestriga rikastatud keskkonnas (Joonis 5a, 1.), samas N2 metsiktüüpi ussidel on rasvavaru OA-CE keskkonnas tunduvalt suurem kui tavalisel NGM-il kasvades (Joonis 5b, 3.). N2 populatsiooni suuremat rasvavaru võib selgitada võibolla sellega, et oleiinhape on pikaahelaliste rasvhapete prekursoriks ning selle külluse korral toimuvad ka sünteesiprotsessid aktiivsemalt. Oleiin (*cis*) kolesterüülestri keskkonnas kasvanud *fat-3* (ok1126) liini varurasva märgatav vähenemine (Joonis 5, 1.) vajab edasistel katsetel sarnaste tulemuste kordudes põhjalikumat uurimist.

Elaidiin (*trans*) kolesterüül estri keskkond ei põhjustanud metsiktüübil ega ka *fat-3* (ok1126) liinil muutusi elueas ega ka rasvavarude hulgas (Joonis 5b 2., 4.). Samade rasvhappe isomeeridega (*cis* ja *trans*), mis olid triglütseriidide koostises on eelnevalt läbi viidud elueakatsed näidanud transrasva keskkonnas kasvanud *fat-3* (wa22 ja ok1126) liinide lühenenud eluiga (Reisner et al., 2010). Kõrvutades triglütseriididega tehtud katsete ja minu töö tulemusi võib järeldada, et rasvhapete metabolismis ja varundamises on oluline roll sellel, mis ühenditesse need on seotud.

Edasistel uuringutel kolesterüülestritega võiks rasvavarude hulga hindamisele järgneda ka lipiidsete tilgakeste koostise analüüs. Huvipakkuv on ka kolesterüülestrite ja triglütseriidide katabolismi erinevus β -oksüdatsioonile eelnevais etappides. Ühe meetodina saaks ehk kasutada fotoaktiivse markeriga sterooli kolesterüülestrite koostises.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli näidata transrasva mõju *C. elegans*-i elueale ja rasvavarudele, võrdluses *cis* isomeeriga. Selleks viisin läbi elueakatse ja värvisin rasvavarusid ussides ning analüüsisin tehtud fotosid.

Kasvukeskkonnadesse lisisin oleiinhappe 18:1 (n-9*cis*) või elaidiinhappe 18:1 (n-9*trans*) kolesterüül-estreid. Elueakatse ei näidanud ei *cis* ega *trans* ühendi puhul olulist erinevust kontrollgrupist. Rasvavaru värvimine näitas, et *fat-3* (ok1126) mutant varundab OA-CE keskkonnas vähem rasva kui tavalisel NGM-il. N2 metsiktüübi rasvavarud on OA-CE(*cis*) keskkonnas aga suuremad kui normaalkeskkonnas. EA-CE(*trans*) ühend ei põhjustanud ühelgi grupil varurasva koguses muutusi.

Sellised tulemused viitavad sellele, et rasvhapete metabolism ja varundamises on oluline roll sellel, mis vormis neid omastatakse. Proovikatsetustest lähtus, et ussid ei ole võimelised kasutama kolesterüülestritesse seotud kolesterooli. Rasvhapete eraldamine kolesterüül estritest nende edasiseks transpordiks on tõenäoliselt erinev sellest mis toimub triglütseriididega. Uurima peaks ka varurasva koostist erinevate dieetide korral.

The effects of *cis*- and *trans* isomers of oleoyl-cholesterylester on the fat storage of the nematode *Caenorhabditis elegans*

Toomas Leppik

SUMMARY

The purpose of the current paper is to study the effects of *trans* fat on *C. elegans* fat storage and lifespan, in comparison with the corresponding *cis* isomer.

The nematode growth medium was supplemented with either cholesteryl oleate 18:1 (n-9*cis*) or cholesteryl elaidate 18:1 (n-9*trans*). Life span assay did not show any significant differences between worms fed with either isomer and the control group. Fat staining showed reduced accumulation of fat in delta-6-desaturase mutant *fat-3 (ok1126)* on cholesteryl oleate diet, whereas in wild type N2 worms the same diet increases the fat stores. Cholesteryl elaidate, on the other hand, did not have any effect on fat storage in either worm strains. Although *trans* fat did not seem to have any effect on fat storage compared to the control group, differences in staining intensities were significant when compared to corresponding *cis*-isomer. One could speculate, that in form of cholesteryl ester the *trans* fatty acid will not be incorporated into nematode's fat stores.

Such results indicate the significance of both the isomerism of fatty acid as well as the lipid compound it is incorporated on fatty acid metabolism and storage. Pilot experiments showed that *C. elegans* is not able to use the cholesterol moiety of dietary cholesteryl esters. The fate of fatty acids derived from degradation of dietary cholesteryl esters can be different from those derived from triglycerides.

KIRJANDUSE LOETELU

M. Abbey & P. J. Nestel (1994). Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is increased when trans-elaidic acid is substituted for cis-oleic acid in the diet . *Atherosclerosis* 106(1):99 107.

K. Ashrafi (2007). Obesity and the regulation of fat metabolism. .
WormBook : the online review of *C. elegans* biology pp. 1 20.

A. Björkholm, et al. (2007). Phosphatidylcholine and sphingomyelin containing an elaidoyl fatty acid can form cholesterol-rich lateral domains in bilayer membranes. . *Biochimica et biophysica acta* 1768(7):1839 1847.

J. E. Chavarro, et al. (2007). Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility. . *Obstetrics and gynecology* 110(5):1050 1058.

R. Clarke & S. Lewington (2006). Trans fatty acids and coronary heart disease . *BMJ* 333(7561):214+.

S. C. Cunnane (2003a). Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? . *Progress in lipid research* 42(6):544 568.

S. C. Cunnane (2003b). Progress in lipid research . *Progress in lipid research* 42(6).

E. V. Entchev, et al. (2005). Role of sterols during dauer formation in *C.elegans* .

R. Estruch, et al. (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. . *Annals of internal medicine* 145(1):1 11.

- D. Falcone, et al. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition . *BMC Plant Biology* 4(1):17+.
- H. Fares & B. Grant (2002). Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. . *Traffic* 3:11 19.
- S. K. Gebauer, et al. (2007). The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. . *Lipids* 42(9):787 799.
- T. A. Hagve & B. O. Christophersen (1984). Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion to C22 fatty acids in isolated rat liver cells. . *Biochimica et biophysica acta* 796(2):205 217.
- A. J. Hulbert & P. L. Else (2000). Mechanisms Underlying the Cost of Living in Animals . *Annual Review of Physiology* 62(1):207 235.
- P. A. Hutzell & L. R. Krusberg (1982). Fatty acid compositions of *Caenorhabditis elegans* and *C. Briggsae* . *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 73(3):517 520.
- M. B. Katan, et al. (1995). Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. . *Annu Rev Nutr* 15:473 493.
- L. Lagrost (1992). Differential effects of cis and trans fatty acid isomers, oleic and elaidic acids, on the cholesteryl ester transfer protein activity . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1124(2):159 162.
- I. Levitan, et al. (2010). Cholesterol and ion channels. . *Sub-cellular biochemistry* 51:509 549.

- A. Maguy, et al. (2006). Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function . *Cardiovascular Research* 69(4):798 807.
- H. Y. Y. Mak, et al. (2006). Polygenic control of *Caenorhabditis elegans* fat storage. . *Nature genetics* 38(3):363 368.
- V. Matyash, et al. (2001). Distribution and Transport of Cholesterol in *Caenorhabditis elegans* . *Molecular Biology of the Cell* 12(6):1725 1736.
- M. Merris, et al. (2003). Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans* . *Journal of Lipid Research* 44(1):172 181.
- D. Mozaffarian, et al. (2009). Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. . *European journal of clinical nutrition* 63 Suppl 2.
- A. O. Odegaard & M. A. Pereira (2006). Trans fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes. . *Nutrition reviews* 64(8):364 372.
- E. J. O'Rourke, et al. (2009). *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. . *Cell metabolism* 10(5):430 435.
- E. J. O'Rourke, et al. (2013). -6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy . *Genes & Development* 27(4):429 440.
- H. H. Patel & P. A. Insel (2009). Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. . *Antioxidants & redox signaling* 11(6):1357 1372.
- H. H. Patel, et al. (2008). Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. . *Annual review of pharmacology*

and toxicology 48(1):359 391.

L. Rainer & C. J. Heiss (2004). Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. . Journal of the American Dietetic Association 104(6).

K. Reisner, et al. (2011). Trans fat diet causes decreased brood size and shortened lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase mutant fat-3. . Journal of biochemical and molecular toxicology 25(5):269 279.

K. Simons & E. Ikonen (2000). How Cells Handle Cholesterol . Science 290(5497):1721 1726.

A. P. Simopoulos (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. . Biomedicine & pharmacotherapy

M. Suzuki, et al. (2011). Lipid droplets: size matters . Journal of Electron Microscopy 60(suppl 1):S101 S116.

T. Tanaka, et al. (1996). Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. . Lipids 31(11):1173 1178.

A. K. Thompson, et al. (2008). Trans-fatty acids and cancer: the evidence reviewed . Nutrition Research Reviews 21(02):174 188.

F. S. S. Vieira, et al. (2010). Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? . Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization 102(7):391 407.

J. L. Watts, et al. (2003). Deficiencies in C20 polyunsaturated fatty acids cause behavioral and developmental defects in *Caenorhabditis elegans* fat-3 mutants. . Genetics 163(2):581 589.

P. F. Wilde & R. M. Dawson (1966). The biohydrogenation of alpha-linolenic acid and oleic acid by rumen micro-organisms. . The Biochemical journal 98(2):469 475.

R. B. Woodward, et al. (1952). The Total Synthesis of Steroids1 . J. Am. Chem. Soc. 74(17):4223 4251.

S. Zhang, et al. (2010a). Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans* . BMC Cell Biology 11(1):96+.

S. O. Zhang, et al. (2010b). Genetic and dietary regulation of lipid droplet expansion in *Caenorhabditis elegans* . Proceedings of the National Academy of Sciences 107(10):4640 4645.

M. Zilmer, Ello Karelson, Tiiu Vihalemm, Aune Rehema, Kersti Zilmer (2006) Inimorganismi biomolekulid ja metabolismm

KASUTATUD INTERNETILEHEKÜLJED

1. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/lipidstruct/ollipidintro1.html>
2. <http://courses.washington.edu/conj/membrane/fattyacids.htm>
3. <http://blogs.dnalc.org/2012/04/12/bad-cholesterol/>
4. <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/cholest/index.htm>
5. <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1>
6. <http://www.chemicalbook.com>
7. <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/621fattyacidrx.html>
8. www.wormbook.org

LISAD

1. Foto Oil Red O meetodil värvitud ussist



Foto: F7_N2_OA-CEx20

2. Eluekatse tulemuste kokkuvõttev table

Tabel 2: Eluekatse tulemuste kokkuvõte

	<i>fat</i> -3 NGM	<i>fat</i> -3 OA-CE	<i>fat</i> -3 EA-CE
Keskmine eluiga	16,75	18,05	14,8
standardhälve	4,45	3,68	3,09
p väärtus		0,258	0,163

TÄNUSÕNAD

Suur tänu Kaja Reisnerile, kes mind juhendas.

Suur tänu Peeter Laasile, kelle abiga õnnestus teha piltide analüüs.

Suur suur aitäh, alati vastutulelikele, Kärdile ja Mallele arengubioloogia laboratooriumist.

Suur tänu kõigile kallitele inimestele, kes mind innustasid.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Toomas Leppik
(sünnikuupäev: 24.07.1984)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Oleiinhappe cis- ja trans-isomeeride kolesteriülestrite mõju rasva varundamisele *Caenorhabditis elegans*'is

mille juhendaja on Kaja Reisner, Ph.D.

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013.