

Thesis Title	Lipid Utilization of the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zinc Cluster Deletion Strains
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Siripat Jansuriyakul
Thesis Advisor	Dr. Nitnipa Soontorngun
Program	Master of Science
Field of Study	Biochemical Technology
Department	Biochemical Technology
Faculty	School of Bioresources and Technology
Academic Year	2013

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is a model organism widely used to study eukaryotic transcription. It is able to utilize various carbon substrates such as glycerol, ethanol and oils as well as fatty acids for growth and energy generation. In *S. cerevisiae*, zinc cluster proteins form a major class of transcription regulators. They play important roles in controlling expression of genes in various cellular processes, including sugar metabolism, amino acid synthesis, lipid metabolism and stress response. However, function of some zinc cluster proteins remains unknown. This study examined the involvement of some zinc cluster regulators of unknown function in lipid utilization. The phenotypes of zinc cluster deletion strains during growth on fatty acids or oils were examined. We found that five zinc cluster deletion strains (FZH, YZS, FZG, FZP and FZT) showed impaired growth on media, containing lipid or oil as a sole carbon source. The lipid class profiles of these zinc cluster deletion strains were analyzed and found that, using oleic acid as a sole carbon source, free fatty acid content of the FZG strain is increased by approximately 3-fold when compared with glucose grown condition. The sensitivity of these zinc cluster deletion strains in the presence of an oxidative agent menadione was also determined. The result showed that these zinc cluster deletion strains show defective growth upon the exposure to menadione, especially for the FZG strain. Then, the FZG strain (also called the $\Delta yil130w$ strain) was examined for the expression of genes required in lipid utilization by quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. The results showed that Yil130w is involved in the

activation of genes in lipid utilization, including triacylglycerol lipase (*TGL3*), peroxisomal transporter (*PXA1*), β -oxidation (*POX1*, *FOX2* and *POT1*), gluconeogenesis and glyoxylate cycle (*ICL1* and *PCK1*). Moreover, neutral lipid profiles of the FZG strain, grown at the exponential growth phase, showed high triacylglycerol (TAG) content at a similar level as found for the stationary phase cells. This result suggested that the $\Delta yil130w$ strain is unable to break down TAG. In summary, our results indicated a new set of zinc cluster proteins that are involved in lipid utilization. Importantly, the zinc cluster protein Yil130w is shown to function as a new transcriptional regulator of lipid utilization genes, including *TGL3*, *PXA1*, *POX1*, *FOX2*, *POT1*, *MDH2*, *ICL1* and *PCK1* genes.

Keywords: Lipid utilization/ Menadione/ Oxidative stress/ *Saccharomyces cerevisiae*/ Zinc cluster protein

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กระบวนการใช้ลิปิดของสายพันธุ์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่ขาดยีนในกลุ่ม zinc cluster
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวศิริพัฒน์ เจนสุริยะกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. นิษกัณิภา สุนทรกุล
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

Saccharomyces cerevisiae เป็นแม่แบบของสิ่งมีชีวิตที่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษากระบวนการถอดรหัสทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต เนื่องจากยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดในการเจริญเติบโตและสร้างพลังงานแก่เซลล์ อาทิเช่น กลีเซอรอล เอทานอล ไตรเอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมัน การควบคุมการถอดรหัสทางพันธุกรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* มีกลุ่มโปรตีนที่สำคัญเรียกว่า zinc cluster ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์น้ำตาล การสังเคราะห์กรดอะมิโน เมตาบอลิซึมของลิปิด และการตอบสนองต่อสภาวะเครียด อย่างไรก็ตามยังมีโปรตีน zinc cluster บางตัวที่ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน zinc cluster เหล่านี้ โดยเน้นในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการใช้ลิปิด โดยการตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ของยีสต์ที่ขาดยีนในกลุ่ม zinc cluster ภายใต้สภาวะที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยไตรเอซิล กลีเซอรอลหรือกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ผลการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์ที่ขาดยีนในกลุ่ม zinc cluster 5 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ FZH YZS FZG FZP และ FZT มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติในแหล่งอาหารเหล่านี้ซึ่ง เมื่อใช้กลูโคสหรือกรดโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ผลการวิเคราะห์หาลิปิดโปรไฟล์แสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันธุ์ FZG ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีกรดโอเลอิก เซลล์มีปริมาณของกรดไขมันอิสระที่สูงกว่าในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 3 เท่า ผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบการตอบสนองของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ข้างต้นต่อสภาวะที่มีสารก่ออนุมูลอิสระ menadione และพบว่ายีสต์สายพันธุ์ที่ขาดยีนในกลุ่ม zinc cluster เหล่านี้มีการเจริญเติบโตที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ปกติ โดยเฉพาะสายพันธุ์ FZG มีการเจริญเติบโตลดลงมากที่สุด จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

กับการใช้ลิปิดในสายพันธุ์ FZG (ที่เรียกอีกชื่อว่า *Δyil130w*) ด้วยเทคนิค quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน Yil130w ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในกระบวนการใช้ ลิปิด ได้แก่ triacylglycerol lipase (*TGL3*) peroxisomal transporter (*PXA1*) กระบวนการ β -oxidation (*POX1 FOX2* และ *POT1*) กระบวนการ gluconeogenesis และ กระบวนการ glyoxylate (*ICL1* และ *PCK1*) นอกจากนี้การวิเคราะห์หาลิปิดโปรไฟล์ของยีสต์สายพันธุ์ FZG พบว่าในระยะที่ยีสต์มีการแบ่งตัวแบบทวีคูณ เซลล์มีปริมาณของไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) สูงในระดับเดียวกับเซลล์ที่เจริญเติบโตในระยะคงจำนวนเซลล์ ซึ่งคาดว่าสายพันธุ์ FZG ไม่สามารถสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลได้

จากผลการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่ามีกลุ่มของโปรตีน zinc cluster ใหม่ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ลิปิดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะโปรตีน Yil130w ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวใหม่ ที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องในการใช้ลิปิด ได้แก่ ยีน *TGL3 PXA1 POX1 FOX2 POT1 MDH2 ICL1* และ *PCK1* เป็นต้น

คำสำคัญ: กระบวนการใช้ลิปิด/ โปรตีน zinc cluster/ สภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน/ menadione/ *Saccharomyces cerevisiae*