

Ds-123

mej Ds-123

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

ISTRAŽIVANJE BIOHEMIJSKIH SIGNALA U PETIT
MUTANTIMA KVASCA - IZAZVANIH BENOMILOM

- doktorska disertacija -

MR DRAGINJA PERIČIN

Novi Sad, 1987.

Ova disertacija radjena je u Institutu za mikrobiološke procese i primenjenu hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu i Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Uz duboko poštovanje, posebnu zahvalnost izražavam dr Stojanu Grujiću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, na interesovanju i korisnim savetima tokom ovog rada.

Iskrenu zahvalnost izražavam dr Jovanu Vučetiću, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Beogradu, dr Suzani Petrović, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu i dr Nadeždi Ružić, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na dragocenim savetima prilikom definitivnog uobličavanja ovog rada.

Iskreno se zahvaljujem dr Ljubici Vrbaški, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koja me je uvela u svet mikroorganizama i lepotu njihovog izučavanja.

Dr Jovici Milinu, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, dr Ištvanu Verešbaranju, naučnom savetniku Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, mr Mirjani Latkovskoj, asistentu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, Milici Zagorac, tehničkom saradniku Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu i dr Slavku Kevrešanu, docentu Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, najsrdačnije se zahvaljujem na pruženoj pomoći.

Zahvalnost dugujem i Aleksandri Kolarić, profesoru srpsko-hrvatskog jezika, na korisnim savetima o konačnom izgledu ovog rada.

Mojim roditeljima

*"Misliti je lako, raditi teško:
raditi, sledeći svoju zamisao,
najteža je stvar na svetu"*

J.V.Gete

S A D R Ź A J

| | | |
|------|--|-------|
| I. | UVOD | I-III |
| II. | OPŠTI DEO | 1 |
| | 1. FUNGICID BENOMIL, NJEGOVO DEJSTVO I METABOLIZAM | 1 |
| | 2. SISTEMI ZA ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOSTI PESTICIDA | 3 |
| | 2.1. Testovi za detekciju genske mutacije izazvane benomilom | 4 |
| | 2.2. Testovi za detekciju hromozomske promene izazvane benomilom | 6 |
| | 2.3. Testovi za detekciju primarnog oštećenja DNA benomilom | 7 |
| | 3. RESPIRATORNO-DEFICIJENTNI (RD) MUTANTI, KAO TEST SISTEMI ZA UTVRDJIVANJE GENOTOKSIČNOSTI HEMIJSKIH JEDINJENJA | 8 |
| | 3.1. Struktura i biogeneza mitohondrija petit mutanta pekarskog kvasca | 10 |
| | 3.2. Nuklearni petit mutanti u izučavanju biogeneze mitohondrija | 14 |
| | 3.3. Proteinski sastav membranskog sistema mitohondrija | 15 |
| | 3.4. Lipidni sastav mitohondrijske membrane.. | 20 |
| III. | MATERIJAL I METODE | |
| | 1. PRIPREMA I UPOTREBA ČELIJSKIH KULTURA | 22 |
| | 1.1. Priprema ćelija za biohemijsko ispiti- vanje | 22 |
| | 2. MERENJE RESPIRACIJE ČELIJA KISEONIČNOM ELEKTRODOM | 23 |
| | 2.1. Merenje brzine endogene respiracije ćelija pekarskog kvasca | 23 |
| | 2.2. Odredjivanje prividne K_m i V_{max} ćelija petit mutanta pekarskog kvasca prema glukozi | 23 |
| | 3. PRIPREMA ČELIJSKOG HOMOGENATA | 24 |
| | 3.1. Razdvajanje izoenzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze EC(1.1.1.49) i heksokinaze EC(2.7.1.1) blok elektroforezom na poli- akrilamidnom gelu | 25 |
| | 3.2. Odredjivanje aktivnosti enzima gluko- ze-6-fosfat dehidrogenaze EC(1.1.1.49) i heksokinaze EC(2.7.1.1) | 26 |
| | 3.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina če- lijskog homogenata i mitohondrija | 26 |

| | |
|--|----|
| 4. KVANTITATIVNO ODREĐJIVANJE CITOHROMA U IN-TAKTNIM ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA | 28 |
| 5. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA ČESTICA ZA TRANSPORT ELEKTRONA | 29 |
| 6. ANALIZA LIPIDA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA .. | 30 |
| 6.1. Ekstrakcija lipida iz mitohondrija | 33 |
| 7. IZOLOVANJE MITOHONDRIJA IZ ČELIJA PEKARSKOG KVASCA | 34 |
| 7.1. Karakterizacija mitohondrijske frakcije | 34 |
| 8. ODREĐJIVANJE AKTIVNOSTI ADENOZINTRIFOSFATA-ZE EC(3.6.1.4) | 36 |
| 9. ODREĐJIVANJE SADRŽAJA NUKLEINSKIH KISELINA .. | 36 |
| 10. ODREĐJIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA | 36 |
| 11. ODREĐJIVANJE AMINOKISELINSKOG SASTAVA PROTEINA | 37 |
| 12. TEST I OCENA RAZLIKE IZMEDJU DVE SREDINE IZ DVA UZORKA | 37 |

IV. REZULTATI

| | |
|--|----|
| 1. RESPIRACIJA ČELIJA PEKARSKOG KVASCA | 39 |
| 1.1. Indukcija brzine respiracije ćelija kvasca glukozom | 43 |
| 1.2. Aktivnost enzima glikolitičkog ciklusa u ćelijama pekarskog kvasca | 46 |
| 1.3. Aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze u ćelijama pekarskog kvasca | 50 |
| 2. SADRŽAJ CITOHROMA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA | 55 |
| 2.1. Karakterizacija "ETP"-čestica iz ćelija pekarskog kvasca | 59 |
| 3. KARAKTERIZACIJA PROTEINA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA | 64 |
| 4. LIPIDNI SASTAV ČELIJA PEKARSKOG KVASCA | 68 |
| 5. SADRŽAJ NUKLEINSKIH KISELINA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA | 81 |
| 6. MORFOLOGIJA ČELIJA PEKARSKOG KVASCA I NJENIH KONSTITUENATA | 84 |
| 7. STRUKTURA I FUNKCIJA MITOHONDRIJA IZ ČELIJA PEKARSKOG KVASCA | 86 |
| 7.1. Analiza enzima kompleksa II i V respiratornog lanca ćelija pekarskog kvasca ... | 90 |
| 7.1.1. Intracelularna distribucija enzima sukcinat dehidrogenaze u ćelijama pekarskog kvasca | 90 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 7.1.2. | Distribucija i aktivnost ATP-aze u ćelijama pekarskog kvasca | 94 |
| 7.1.3. | Kinetički parametri H^+ -ATP-aze mikrozomalne frakcije petit mutantata (RD-1) pekarskog kvasca | 101 |
| 7.1.4. | Identifikacija mitohondrijske ATP-aze ili "oligomicin-osetljive" ATP-aze | 104 |
| 7.2. | Sastav proteina mitohondrijske frakcije ćelija pekarskog kvasca | 107 |
| 7.3. | Sadržaj fosfolipida u mitohondrijama pekarskog kvasca | 110 |

V. DISKUSIJA

| | | |
|-------|--|-----|
| 1. | ENDOGENA RESPIRACIJA I AFINITET USVAJANJA GLUKOZE? ĆELIJA PETIT MUTANTA | 116 |
| 2. | SASTAV CITOHROMA U ĆELIJAMA PETIT MUTANTA PEKARSKOG KVASCA | 121 |
| 3. | ELEKTROFORETSKA ANALIZA UKUPNIH PROTEINA I GENSKA VARIJABILNOST | 122 |
| 4. | SADRŽAJ LIPIDA KAO POKAZATELJ PROMENA U ĆELIJAMA MUTANATA PEKARSKOG KVASCA | 123 |
| 5. | SADRŽAJ NUKLEINSKIH KISELINA I MORFOLOGIJA ĆELIJA I JEDRA PEKARSKOG KVASCA | 126 |
| 6. | MORFOLOGIJA, STRUKTURA I HEMIJSKI SASTAV MITOHONDRIJA PEKARSKOG KVASCA | 127 |
| 7. | SASTAV MITOHONDRIJSKE MEMBRANE PEKARSKOG KVASCA KOD ISPITIVANIZ ĆELIJA | 131 |
| VI. | ZAKLJUČAK | 135 |
| VII. | CONCLUSION | 138 |
| VIII. | BIOGRAFIJA | 141 |

SKRAĆENICE

| | |
|----------------|--|
| RNA | Ribonukleinska kiselina |
| DNA | Dezoksiribonukleinska kiselina |
| rRNA | Ribozomalna ribonukleinska kiselina |
| tRNA | Transfer ribonukleinska kiselina |
| mRNA | Mesendžer ribonukleinska kiselina |
| Tris | 2-amino-2-(hidroksimetil)1,3-propandiol |
| TCA | Trihlorsirćetna kiselina |
| EDTA | Dinatrijumova so etilendiaminotetrasirćetna kiselina |
| SDS | Natrijum-dodecilsulfat |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminoetan |
| ATP | Adenozin-5-trifosfat |
| PC | Fosfatidilholin |
| PE | Fosfatidiletanolamin |
| CL | Kardiolipin |
| ITM | Izotonični izolacioni medijum |
| HIM | Hipotonični izolacioni medijum |
| ATP-aza | Adenozintrifosfataza |
| R | Divlji soj pekarskog kvasca |
| RD | Petit mutanti pekarskog kvasca |
| j.DNA | Dezoksiribonukleinska kiselina jedra |
| mit.DNA | Dezoksiribonukleinska kiselina mitohondrija |
| NADH | Nikotinadenindinukleotid (redukovani) |
| FADH | Flavinadenindinukleotid (redukovani) |
| ETP | Čestice za prenošenje elektrona |
| Co-A | Koenzim - A |
| PMS | N-metil-fenazonimetasulfat |
| NBT | Nitrotetrazolijum plavo |
| C _n | Broj ugljenikovih atoma, masnih kiselina, slobodnih i vezanih u triacilglicerolima |

I U V O D

Poznato je da velik broj hemijskih jedinjenja ima genotoksično dejstvo. Prema Ehrenbergu i saradnicima (1) ovo svojstvo poseduju sva hemijska jedinjenja koja imaju toksično ili letalno dejstvo i izazivaju nasledne promene na nuklearnom i ekstranuklearnom genetskom materijalu u reproduktivnim i somatskim ćelijama.

Prema podacima OECD-a (1986) (215), u svetu je danas poznato oko pet miliona različitih hemijskih jedinjenja od kojih se osamdeset hiljada komercijalno proizvodi, te prema tome dolazi u dodir sa čovekom, kroz njihovu upotrebu u industriji, poljoprivredi, zdravstvu, putem hrane, lekova, kozmetičkih preparata, vode i vazduha (194). Hemijska jedinjenja sa genotoksičnim dejstvom nadjena su u svim glavnim grupama jedinjenja sa kojima čovek dolazi u dodir. Velika izloženost ljudske populacije potencijalnim genotoksičnim agensima, postepeno može dovesti do znatnog narušavanja kvaliteta života izložene generacije i budućih generacija. Iz tog razloga nameće se potreba da se ispita genotoksično dejstvo svih hemijskih jedinjenja koja dolaze u dodir sa čovekom.

Za ispitivanje genotoksičnosti hemijskih jedinjenja upotrebljavaju se razni test-sistemi (eksperimentalni organizmi). Radi što bolje ekstrapolacije genotoksičnog dejstva hemijskih jedinjenja sa test-organizma na čoveka, upotrebljavaju se životinjski test-organizmi. Medjutim, kako su genetički materijal i nasledni procesi slični u svim živim organizmima, sposobnost indukcije naslednih promena moguće je pratiti i na nižim organizmima u kulturi ćelija i ćelijama mikroorganizama. Neki od ovih testova služe za utvrđivanje da li je neko hemijsko jedinjenje mutageno ili nije, a neki testovi omogućuju procenu rizika za ljudsku populaciju.



Medju hemijskim jedinjenjima koja pokazuju genotoksično dejstvo, pesticidi zauzimaju značajno mesto. Iz tog razloga pesticidi prema važećim propisima datim od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 1985 i OECD, 1986) moraju se pored ispitivanja na karcinogenost, teratogenost i dejstva na reprodukcionu moć, ispitati i na mutagenost u najmanje dva test-sistema od kojih se jedan odnosi na genske a drugi na hromozomske mutacije (2). Ovakvi zahtevi za utvrđivanje genotoksičnosti pesticida kod nas i u svetu, nametnuli su potrebu razvijanja novih metoda i test-sistema, kao i unapredjivanje postojećih.

Postojeći pesticidi, koji su u prometu deset i više godina kao što su grupa ditiokarbamata, benzimidazola, ftalamidi i dr, nalaze se u proceduri preispitivanja kod nas i u svetu, a na bazi njihovog genotoksičnog dejstva (2).

Imajući u vidu sve navedeno, smatrali smo da je od interesa da se preko biohemijskih karakteristika (signala) istraži genotoksično dejstvo predstavnika benzimidazolskih pesticida fungicida benomil (metil-1-(butilkarbamoil)-2-benzimidazol karbamat). Kao test-organizam za ispitivanje genotoksičnog dejstva fungicida benomil upotrebljeni su sojevi pekarskog kvasca.

Petit mutanti pekarskog kvasca izazvani drugim mutagenima (3,4,5,6,7,160) poznati su već duže vreme. Petit mutanti kvasca sa oštećenim disanjem nazivaju se još respiratorno-deficijentni mutanti (RD-mutanti). Ovo svojstvo može se povezati sa specifičnim oštećenjem jedne ili više funkcija mitohondrija. Sinteza funkcionalno sposobnih mitohondrija stoji pod zajedničkom kontrolom dva genetska sistema: jedarne DNA (jed.DNA) i mitohondrijske DNA (mit.DNA). U zavisnosti od toga razlikuju se dve glavne vrste petit mutanta - takozvani "nuklearni" (jed.DNA) i "citoplazmatični" (mit.DNA).

Prema radovima Vrbaške i saradnika (8) i Gunasekarena i Taura (42, 71), primenom mikrobiološke metode (9) ustanovljeno je da benomil na neke sojeve pekarskog kvasca deluje

mutageno tako da stvaraju petit mutante. Isto tako prema radovima Kovača i saradnika (176) i Arandjelovića (213), ustanovljeno je da se dejstvom azotaste kiseline na ćelije pekarskog kvasca (176) i dejstvom N-metil-N-nitro-N-nitrozogvanidina na ćelije kvasca *Candida lipolytica* (213), dobivaju petit mutanti koji nisu respiratorno deficijentni.

Naša istraživanja su imala za cilj da se pomoću specifičnih biohemijskih parametara na ćelijama i mitohondrijama, ustanovi i da li su petit mutanti dobiveni pod dejstvom benomila i respiratorno-deficijentni, odnosno da li su tzv. RD-mutanti. Zatim, da se na jednom divljem soju i odgovarajućem RD-mutantu, koji je dobiven dejstvom benomila, izvrši svestrana karakterizacija mikroorganizma biohemijskim metodama, kako bi se upoređivanjem mogla sagledati posledica genetičkih promena izazvanih benomilom.



II. O P Š T I D E O

1. FUNGICID BENOMIL, NJEGOVO DEJSTVO I METABOLIZAM

Benomil ima hemijski naziv metil-1-(butilkarbamoil)-2-benzimidazol karbamat, i po svojim svojstvima pripada grupnim fungicidima. Godine 1970. registrovan je kao grupni fungicid u velikom broju zemalja uključujući i Jugoslaviju.

Slično kao i drugi benzimidazolski fungicidi ima širok antifungicidni spektar dejstva na *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i neke druge *Deuteromycetes*, dok je potpuno bez dejstva na *Phycomycetes fungi* (10 i 11).

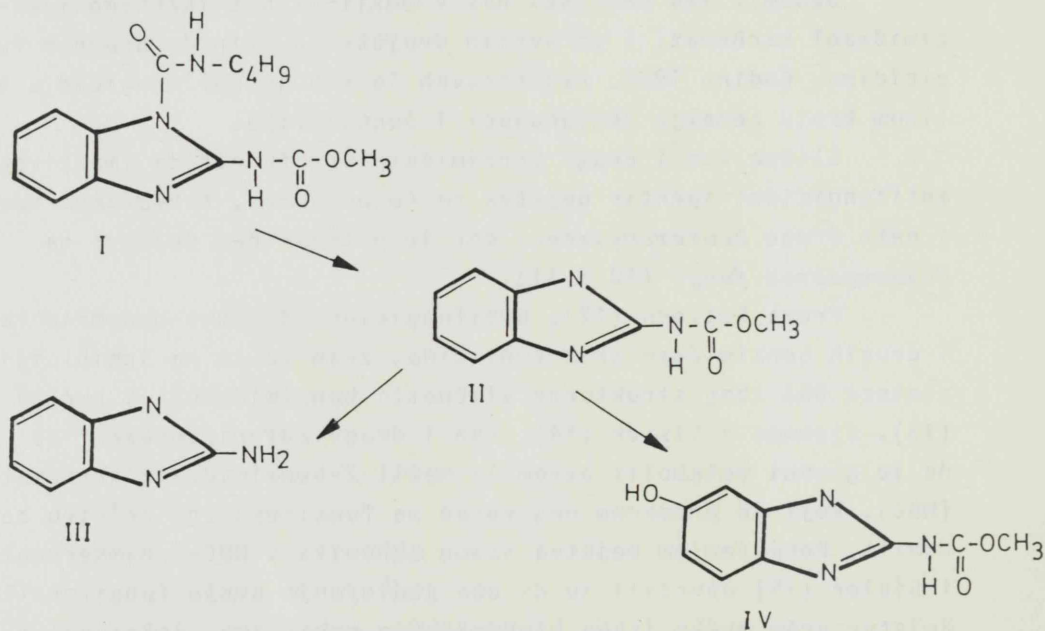
Prema Seileru (12), antifungicidno dejstvo benomila kao i drugih benzimidazolskih fungicida, zasniva se na inhibiciji sinteze DNA zbog strukturne sličnosti benzimidazola i purina (13). Clemons i Sisler (14), kao i drugi autori, dokazali su da je glavni metabolit benomila metil-2-benzimidazol karbamat (MBC), koji je primarno odgovoran za fungitoksično dejstvo benomila. Poredjenjem dejstva samog benomila i MBC-a, Hammerschlag i Sisler (15) utvrdili su da oba jedinjenja svoje fungitoksično dejstvo vrše preko istog biohemijskog mehanizma, izazivanjem inhibicije u sintezi DNA i citokinezi. Mada je mehanizam fungitoksičnog dejstva benomila i njegovog metabolita (MBC) isti, njihovi metabolički efekti na ćelije su različiti. Benomil parcijalno inhibira respiraciju subcelularnih čestica iz gljiva, dok MBC nema takav efekt. Razlika u dejstvu između MBC-a i benomila verovatno je usledila zato što benomil pored MBC-a, stvara i isparljiv butilizocijanat (BIC) (14). Iz tog razloga fungitoksično dejstvo benomila je združeno dejstvo kombinovanih efekata njegovih produkata MBC i BIC-a.

Eksperimenti Baudea i saradnika (16), sa obeleženim C^{14} -benomilom pokazali su da folijarnom primenom na biljkama, benomil ostaje nerazgradjen 21-23 dana. Nerazgradjen benomil bolje prodire u biljku od MBC-a (15, 17, 18). S druge strane,



nadjeno je da benomil u biljkama pored MBC-a daje i drugi metabolit (2-AB) 2-aminobenzimidazol (19) (slika 1).

Metabolički put razgradnje benomila prikazan je na slici 1.



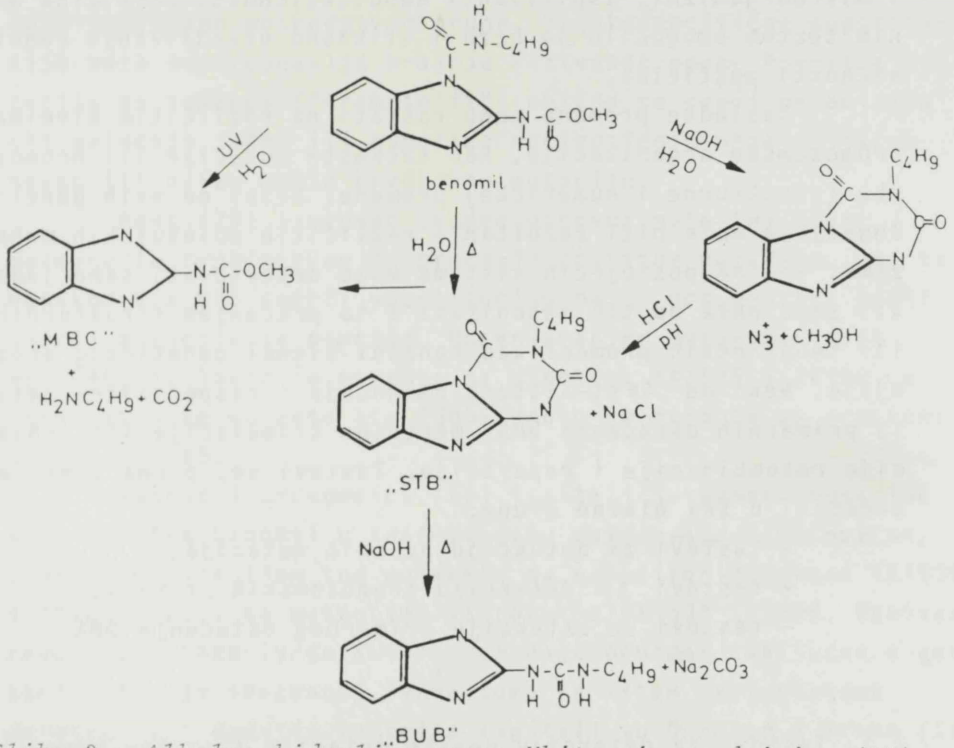
Slika 1 - Metabolička transformacija benomila u biljnim i životinjskim ćelijama prema Seileru (12)

(I - benomil, II - metil-2-benzimidazol karbamat, III - 2-aminobenzimidazol, IV - metil-5-hidroksi-2-benzimidazol karbamat)

U vodenim rastvorima kao i u ćelijama biljaka, benomil (I) se sporo hidrolizuje u metil-2-benzimidazol karbamat (II) (14, 12, 20), a daljom transformacijom u ćelijama biljaka do 2-aminobenzimidazol III(19), dok u ćelijama sisara dolazi do hidroksilacije na 4. ili 5. ugljenikovom atomu IV (21, 22).

Prema radovima Whitea i saradnika (23), kao i drugih autora (24), benomil nakon hemijske alkalne hidrolize (slika 2),

može dati još dva proizvoda: 1,2,3,4-tetrahidro-3-butil-2,4-dioksotriazino-(a)-benzimidazol "STB" i 2 (3-butilureido)-benzimidazol "BUB". Nakon alkalne hidrolize benomila, ova dva proizvoda dosad nisu nadjena u prirodnom materijalu, čak ni u kombinaciji sa alkalnim pesticidima na bazi sumpora i bakra (16).



Slika 2 - Alkalna hidroliza prema Whiteu i saradnicima (23)

2. SISTEMI ZA ISPITIVANJE GENOTOKSIČNOSTI PESTICIDA

Genotoksično dejstvo pesticida, kao i drugih hemijskih jedinjenja, može se ispitati na različitim test-organizmima. U novije vreme, zbog sve veće potrebe analiza genotoksičnih jedinjenja, uvodi se i razvija nova metodologija koja bi omogućila brzo i pouzdano otkrivanje genotoksičnog dejstva pesticida.

Svetska zdravstvena organizacija dala je glavne smernice izučavanja mutagenosti hemijskih jedinjenja kod eksperimentalnih životinja, kao i moguću ekstrapolaciju dobivenih rezultata

na čoveka (2). Poznato je da se najvernija ekstrapolacija dobiva sa životinjskih test-organizama na čoveka. Nedostatak ovih test-organizama i testova jeste što su ovakve analize dugotrajne. Zbog velike sličnosti u genetskom aparatu svih živih organizama, moguće je da se za test-organizme upotrebe i mikroorganizmi. Ispitivanje genotoksičnosti pesticida mikrobnim testom omogućilo je brzo i efikasno utvrđivanje genotoksičnosti pesticida.

Nasledne promene mogu nastati na različitim nivoima hromozomske organizacije, kao tačkaste mutacije ili hromozomske (strukturne i numeričke) promene. Svaki od ovih genetičkih događaja može biti rezultanta različitih molekulskih mehanizama. Većina postojećih sistema može detektovati samo jedan ili samo neke od tih mehanizama i to praćenjem strukturnih ili fenotipskih promena kao konačni signal genetičkog događaja. Neki od test-sistema omogućuju i nespecifičnu detekciju primarnih oštećenja DNA, merenjem stimulacije ili inhibicije rekombinacije i reparacije. Testovi se, prema tome, mogu svrstati u tri glavne grupe:

- testovi za detekciju genskih mutacija,
- testovi za detekciju hromozomskih promena,
- testovi za detekciju primarnog oštećenja DNA.

2.1. Testovi za detekciju genske mutacije izazvane benomilom

Za praćenje indukcije tačkastih mutacija razradjeni su test-organizmi sa mikroorganizmima (bakterije, plesni, kvasci), biljkama (*Tradescantia*), insektima (*Drosophila*), ćelijama sisara u kulturi, te test specifičnog lokusa na miševima. Praćenje tačkastih mutacija najjednostavnije je na haploidnim organizmima, kod kojih nema prikrivajućeg dejstva nepromenjenog gena homolognog hromozoma.

Za praćenje tačkastih mutacija izazvanih benomilom na bakterijama upotrebljen je test-organizam *Salmonella typhimurium* (25, 26, 27, 28). Ovaj test-organizam uveo je Ames (29) izolacijom mutantnih bakterija u različitim stepenima biosinteze

histidina, a koje se mogu vratiti u divlji soj pod uticajem hemijskih mutagena.

Sistemi za povratne mutacije uključuju mutante koji se vraćaju u divlji soj samo preko vrlo specifičnih tipova genetičke promene. Mutacije izazvane supstitucijom baza mogu revertirati samo posredstvom druge, visokospecifične supstitucije baza koja obnavlja krajnju aktivnost gena. Povratna mutacija sa pomakom ("frameshift") obično se svodi na adiciju ili deleciju jedne ili nekoliko nukleotidnih baza na istom mestu ili blizu mesta prvobitne mutacije.

Ames (29) izolovao je dva osnovna mutantna soja *Salmonelle typhimurium* za praćenje povratne mutacije. Soj sa oznakom *his* G46 sadrži supstituciju baza, dok soj *his* D3052 sadrži mutaciju sa pomakom. Usavršavanjem mutantnog soja *his* G46, izolovao je mutante sa oznakama TA1535 i TA100, a usavršavanjem mutanta *his* D3052 dobio je mutante sa oznakama TA1538 i TA98.

Rashid i Ercegovich (25) ispitali su gensku mutaciju koju izaziva benomil u test-sistemu *Salmonelle typhimurium*, povratnom mutacijom kod mutanata sa supstitucijom baza TA1535 i TA100, kao i sa mutantima sa pomakom TA1538 i TA98. Dobiveni rezultati, kako tvrde autori, ne daju pouzdan zaključak o genskoj mutaciji izazvanoj benomilom. Na istom test-sistemu genotoksično dejstvo benomila ispitali su Donovan i Krahn (26), koji takodje tvrde da benomil u ovom test-sistemu daje negativan rezultat.

Suprotno ovim rezultatima, Kappas i saradnici (27) ukazuju da benomil utiče na mutant TA1535, nastao supstitucijom baza, a ne utiče na mutante sa pomakom TA1538.

Ispitivanjem sposobnosti benomila da izaziva supstituciju baza, praćenjem indukcije povratnih mutacija, upotrebljen je i test-sistem sa bakterijom *Escherichia coli* (27, 30).

Auksotrofni mutant bakterije *E. coli* WP-2 zavisao od triptofana, upotrebljava se za detekciju mutagena koji izazivaju supstituciju baza, praćenjem indukcije povratnih mutacija (31).

Ovim test-sistemom dobiveni su takodje različiti rezultati od strane autora koji su ispitivali mutageno dejstvo benomila. Tako Kappas i saradnici (27) u svom radu pokazuju da je benomil mutagen koji izaziva supstituciju baza i u ovom sistemu, dok rezultati Shirasua i saradnika (30) pokazuju da benomil nema mutageno dejstvo izraženo u ovom test-sistemu.

Ispitivanjem genske mutacije benomilom u test-sistemu "mutacija unapred", Dassenoy i Meyer (32) su na *Fusarium oxysporum* utvrdili da je benomil mutagen koji izaziva gensku mutaciju.

"Mutacije unapred" uključuju različite genetičke promene kao supstituciju baza, adiciju ili deleciju para baza, te pojedinačnog gena ili susednih gena.

2.2. Testovi za detekciju hromozomske promene izazvane benomilom

Nasledne promene na nivou hromozoma obuhvataju promenu u strukturi i broju hromozoma, a mogu se pratiti citološki ili genetički. Strukturne promene su posledica lomova hromozomskih jedinica. Usled loma hromozomskih jedinica, nastaju dva kraja koja mogu ostati slobodna i time izazvati ili gubitak hromozomskog materijala ili povezivanje nastalih krajeva (translokacije, inverzije itd.).

Promena broja hromozoma obično je posledica nepravilnog odeljivanja članova homolognog hromozomskog para u mejozi. Inducirane hromozomske mutacije mogu se pratiti na različitim test-organizmima, od mikrobnih do životinjskih ćelija.

Za praćenje hromozomskog neodeljivanja ("non-disjunction") pod dejstvom benomila, upotrebljena je plesan *Aspergillus nidulans* (33, 34).

Bignami i saradnici (35) izolovali su heterozigotni soj plesni *Aspergillus nidulans*, koji može da raste na podlozi sa p-fluorofenilalaninom samo u slučaju kada dolazi do hromozomskog neodeljivanja ili krosingovera.

Koristeći se ovim sistemom, De Bertoldi i Griselli (33) ispitivali su uticaj benomila na hromozomsko neodeljivanje i utvrdili da benomil ne izaziva promenu na nivou hromozoma.

Medjutim, koristeći se istim test-sistemom, Hastie (34) je dobio rezultate koji ukazuju da benomil izaziva promenu hromozomalnog neodeljivanja. Slične rezultate dobili su i Kappas i saradnici (36).

Citogenetičkim ispitivanjima indukovanih hromozomskih mutacija benomilom, takodje se došlo do kontradiktornih rezultata.

Radovi Fitzpatrika i Krahana (37), kao i Gupta i Legatora (38), ukazuju da benomil nije mutagen na nivou hromozoma, dok rezultati Evansa i Mitchella (39) ukazuju na suprotni zaključak.

2.3. Testovi za detekciju primarnog oštećenja DNA benomilom

Testovi za detekciju primarnih oštećenja DNA su merilo za konačnu strukturu ili fenotipske promene i rezultat su specifičnog oštećenja DNA. Pokazatelji primarnog oštećenja mogu biti događaji koji predstavljaju nespecifičan odgovor ćelije na oštećenje u DNA, kao što su: 1. reparacija DNA, 2. indukcija mitotičkih rekombinacija, 3. indukcija epigenetičkih promena.

Testovi reparacije DNA ne prate samu mutaciju, već oštećenja DNA kao predmutacijski poremećaj izazvan dejstvom supstance, koji će biti podvrgnuti nekom od ćelijskih mehanizama reparacije. Kao test-organizmi mogu se upotrebiti ćelije sisara i mikrobni test.

Benomil je ispitan ovim test-sistemom *in vitro*, u primarnoj kulturi hepatocita (40). Dobiveni rezultati ukazuju da benomil ne indukuje reparaciju DNA.

Za utvrdjivanje primarnog oštećenja DNA benomilom, upotrebljena su i dva test-sistema za praćenje mitotičke rekombinacije: 1. mitotički krosingover (33, 42), 2. mitotička konverzija gena (41, 42).

Mitotički krosingover je recipročna izmena medju hromatidama homolognih hromozoma. Rad De Bertoldija i Grisellija (33) ukazuje da benomil ne izaziva mitotički krosingover u ćelijama *A. nidulans*. Slične rezultate dobili su Sibert i saradnici (41), ispitivanjem indukcije mitotičke konverzije gena pod uticajem benomila na ćelijama pekarskog kvasca. Medjutim, rezultati Gunasekarana i Taura (42) na ćelijama pekarskog kvasca D₇, pokazali su da benomil izaziva mitotički krosingover i mitotičku konverziju gena.

3. RESPIRATORNO-DEFICIJENTNI (RD) MUTANTI, KAO TEST-SISTEM ZA UTVRDJIVANJE GENOTOKSIČNOSTI HEMIJSKIH JEDINJENJA

Istraživanja respiratorne deficijencije kvasca našla su primenu i u mikrobiološkoj genetici. Različiti tipovi kvasca, a posebno *Saccharomyces*, koji poseduju oba mehanizma za snabdevanje ćelije energijom, respiratorni i fermentativni, omogućili su uočavanje respiratorno-deficijentnih mutanata (RD-mutanata). Ćelije pekarskog kvasca koje su usled mutacije izgubile sposobnost da se snabdeju potrebnom energijom respiratornim putem, preživljavaju i potrebnu energiju dobivaju putem glikolize.

Pojavu respiratorno-deficijentnih mutanata u ćelijama kvasca prvi su zapazili Slonimski (43) i Ephrussi (44) još 1949. godine. Slonimski je zapazio da se medju normalnim kolonijama *Saccharomyces cerevisiae* javljaju male kolonije čije su ćelije izgubile sposobnost respiracije. Zbog veličine kolonija, ove mutante Slonimski je nazvao "petit" mutantima, što na francuskom znači mali. Daljim razmnožavanjem ćelije su zadržale ovaj fenotip pa su s razlogom zadržale naziv petit mutanti.

Kasnija ispitivanja pokazala su da respiratorno-deficijentni mutanti ne moraju uvek imati i male kolonije, te se otuda u literaturi mogu naći različiti nazivi za ove mutante: 1. W-varijanta (45, 46, 47, 48), 2. varijanta sekundarne

kolonije (49), 3. R-mutanti (50), 4. pet (ρ^+) (52), 5. PET (ρ^-) (51, 53), 6. RD-mutanti (49). Šarolikost u nazivima za istu pojavu unosila je zabunu, stoga je opšte prihvaćen naziv prema Wildu i Hinshelwoodu (49), skraćena RD odnosno RD-mutanti.

Respiratorno-deficijentni mutanti kvasca pokazuju jasnu razliku u odnosu na respiratorno normalne ćelije kvasca i to s aspekta morfologije, fiziologije a naročito kod enzima u lancu disanja te otuda i čine klasu mutanata.

1. Respiratorno-deficijentni mutanti morfološki se razlikuju od respiratorno normalnih kvasaca po veličini kolonija i ćelija. ćelije petit mutanata (RD-mutanti) gajene na podlozi sa 2% glukoze (43), formiraju male kolonije.

Pored izmenjenog oblika kolonija zapaženo je da i same ćelije kao i njihovi konstituenti (jedro, mitohondrije) imaju izmenjen oblik i veličinu (54, 56).

2. Respiratorno-deficijentni mutanti sa fiziološkom aspekta razlikuju se u odnosu na respiratorno normalne kvasce: 1) smanjenom sposobnošću usvajanja šećera (55), 2) smanjenom biomasom, oko četiri puta, čak u aerobnim uslovima na podlozi glukoze (55), 3) nesposobnošću da rastu na nefermentabilnim supstratima (45, 47), 4) rastom na glukozu ne pokazuju Pasterov efekat (u prisustvu kiseonika fermentacija ostaje nepromenjena) (56).

3. Respiratorno-deficijentnim mutantima nedostaju citohromi \underline{aa}_3 i \underline{b} , ili jedan od ta dva citohroma (57). Raut (58) našao je nedostatak citohroma \underline{aa}_3 i \underline{b} , kao i smanjen sadržaj citohroma \underline{c} . Mora se spomenuti da su Yčas i Starr (59) izolovali mutant koji je bio lišen svih citohroma. Rezultati Nagaija (55) ukazuju da respiratorno-deficijentni mutanti ne poseduju sukcinat dehidrogenazu. Kovač i Hrušovska (60) našli su oštećenje u enzimu koji ima ključnu ulogu u oksidativnoj fosforilaciji (oligomicin-osetljiva ATP-aza).

S obzirom na poreklo promene genetskog sistema, respiratorno-deficijentni mutanti pekarskog kvasca postoje kao citoplazmatični (tj. ne-mendelovski) i nuklearni (tj. mendelovski) petit mutanti (RD-mutanti). Zbog malih kolonija na

čvrstoj podlozi sa ograničenom koncentracijom glukoze, imaju zajednički naziv petit mutanti (43).

Pošto je Slonimski, otkrivanjem pojave petit mutanata izolovao mutant citoplazmatičnog tipa, smatralo se da su petit mutanti isključivo ekstrahromozomski mutanti (43). Citoplazmatični mutanti ćelija kvasaca mogu nastati spontano i indukcijom sa različitim hemijskim jedinjenjima i UV-zracima (51, 53, 61, 62, 63, 64).

S obzirom da je Chen i saradnici (65) ukazao da se ukrštanjem respiratorno-deficijentnih mutanata sa normalnim ćelijama kvasca javlja mendelovski mehanizam nasledjivanja, jasno je bilo da pored citoplazmatičnih mutanata sa oštećenim disanjem postoje i mutanti nuklearnog tipa. Fenotipske odlike nuklearnih mutanata su slične citoplazmatičnim iako nastaju iz pojedinačne genske mutacije. Danas je poznato da brojna hemijska jedinjenja (52, 66, 67), temperatura (68) i UV-zraci (58) mogu izazvati nuklearne petit mutante.

Pored ove dve glavne grupe petit mutanata, nadjena je i grupa "dvostrukih" petit mutanata koji su nastali promenom na hromozomskom i estrahromozomskom genetskom materijalu u ćelijama pekarskog kvasca. Indukcija pojave ovih mutanata može biti izvedena takodje sa velikim brojem hemijskih jedinjenja (52) i UV-zracima (58).

Svi ovi mutanti davali su fenotip deficijentnog ili oštećenog sistema respiracije, što je usko vezano sa funkcijom, strukturom i biogeneom mitohondrija.

3.1. Struktura i biogeneza mitohondrija petit mutanata pekarskog kvasca

Mitohondrije su organele koje ulaze u sastav svih ćelija eukariota (69). Broj, veličina i izgled može se razlikovati u različitim vrstama ćelija.

Formiranje funkcionalno sposobnih mitohondrija uključuje tesnu interakciju nuklearnog i mitohondrijskog genetskog sistema (56, 70). Mehanizam ove medjuzavisnosti jedan je od

centralnih problema biogeneze kao i medjuzavisnosti ova dva genetska sistema.

U kvascima mitohondrijski genetski sistem sintetiše oko 10% ukupne mase mitohondrijskih proteina (68). Genetski sistem mitohondrija limitiran je već veličinom mitohondrijske DNA, koja iznosi 20-25 nm sa molskom masom $5-6 \cdot 10^7$ daltona (53). Shapiro i saradnici (72) dokazali su da je mitohondrijska DNA kvasca cirkularna, a da se linearni oblici mogu naći samo u slučaju deficijencije enzima ligaza (53).

Danas se zna da je samo za mali broj mitohondrijskih sastojaka jednoznačno pokazano da njihovi strukturni geni leže na mit. DNA a to su: različite transportne RNA (t RNA) (53), 16 S i 23 S ribozomalna RNA (r RNA) (53), kao i oko osam različitih proteina (73). Istraživanje proteina kodiranih mit. DNA dovelo je do interesantnog zaključka da svi izgradjuju podjedinice enzima koji ulaze u sastav respiratornog lanca, a koji su kodirani i sa jed. DNA. Tako citohrom oksidaza ima tri podjedinice kodirane mit. DNA, ATP-aza četiri i bc_1 -kompleks jednu (74, 75, 76). Ove podjedinice, zbog svog hidrofobnog sastava verovatno su odgovorne za vezivanje citohrom oksidaze, ATP-aze i bc_1 -kompleksa za mitohondrijsku membranu.

Na osnovu ovih podataka moglo bi se zaključiti da su to upravo oni sastojci koji mogu nedostajati ili biti izmenjeni u citoplazmatičnim petit mutantima. Kao što je već napomenuto, petit mutanti su deficijentni u citohromu aa_3 , citohromu b i smanjenoj aktivnosti ATP-aze.

Medjutim, citoplazmatični petit mutanti imaju izražene mnogostruke biohemijske defekte i neupotrebljivi su za definisanje strukturnih gena i njihovih genetskih proizvoda (77). Upravo ova osobina citoplazmatičnih petit mutanata otvorila je niz pitanja koja se odnose na molekularni mehanizam nastale mutacije i fenotipske odlike ovih mutanata. S obzirom da su kod citoplazmatičnih mutanata oštećene podjedinice enzima lanca disanja i oksidativne fosforilacije, postavlja se pitanje kako se kontroliše u celosti biosinteza različitih funkcionalnih sastojaka oksidativne fosforilacije, ako se na primer

zna da aerobni uslovi stimulišu njihovu sintezu, dok je anaerobni i odredjeni uslovi "kataboličke represije" inhibiraju (78, 79). Takodje je poznato da nedostatak odredjenih membranskih sastojaka, recimo usled mutacije, povlači za sobom nestajanje drugih sastojaka (80). Zatim se nameće pitanje čime je omogućena koordinacija sinteze i korektno povezivanje podjedinica oligomernih enzima kao što je citohrom oksidaza, ATP-aza, itd. kao i drugih oligomernih sastojaka koji čine membranu. Svih pet kompleksa (I, II, III, IV, V) koji čine respiratorni lanac, sastoje se od više podjedinica (74, 81, 82, 83, 84), što bi se moglo protumačiti da odredjene podjedinice deluju regulatorno na sintezu drugih podjedinica istog kompleksa (77). S obzirom da se zna da je vrlo mali broj proteina mitohondrijske membrane sintetisan na mit. DNA (68), postavlja se pitanje kako protiče transport komponenti koje ulaze u sastav mitohondrija ako je njihovo mesto sinteze citoplazma (77). U pojedinim slučajevima postoje eksperimentalni dokazi (85).

Nije poznato da li ugradjivanje sastojaka u membrani protiče prema nekoj vremenskoj ili strukturnoj shemi (77).

Nameće se pitanje o odlučujućim faktorima biohemijske aktivnosti sastojaka integrisanih u mitohondrijskoj membrani. S ovog aspekta moglo bi se pomisliti na protein-protein i protein-lipid interakciju (68, 77).

Opšti put za rešavanje ovih problema, prema Demmeru (77), jeste izolacija mutanata koji su oštećeni u funkciji ili biosintezi pomenutih proteina. Kako je prethodno spomenuto, citoplazmatski mutanti nisu pogodni za karakterizaciju strukturnih gena. Velik doprinos mogu dati ispitivanja na nuklearnim petit mutantima *Saccharomices cerevisiae*.

Nuklearni petit mutanti nastaju iz pojedinačnih genskih mutacija i zbog toga pokazuju Mendelovu segregaciju, ukrštanjem sa normalnim sojevima (65, 58, 86). Chen i saradnici (65) dokazali su da ovi nuklearni mutanti mogu postojati u dva stanja: mogu biti ili ne biti upotpunjeni citoplazmatskom mutacijom. Yotsuyanagi (54) ispitivao je morfologiju mitohondrija nuklearnih petit mutanata, upoređujući ih sa

mitohondrijama "dvostrukih" petit mutanata, zatim sa citoplazmatičnim petit mutantima i mitohondrijama ćelija divljeg soja. Isti autor je došao do zaključka da su mitohondrije citoplazmatičnih mutanata normalno razvijene sve do pred kraj ciklusa rasta. Kako brzina rasta opada, razlike se povećavaju. Yotsuyanagi takodje ukazuje da citoplazmatični petit mutanti stvaraju mitohondrije sa polimorfnim položajem.

Mitohondrije nuklearnih petit mutanata pokazuju najveće razlike u samom početku rasta, dok se u stacionarnom stanju one ne razlikuju od mitohondrija u ćelijama divljeg soja.

Dvostruki mutanti slični su citoplazmatičnim a ne nuklearnim mutantima.

Rezultati Sagera (56) dali su takodje značajan doprinos istraživanju strukture i morfologije mitohondrija petit mutanata kvasca. Njegovi rezultati ukazuju da su mitohondrije petit mutanata slične onima u divljem soju, koje su pretrpele represiju glukozom.

Pored morfoloških izmena u mitohondrijama, nuklearni petit mutanti pokazuju različite fenotipove.

Mnogi nuklearni mutanti su specifično deficijentni samo u jednom citohromu kao što su citohrom aa_3 ili b (52, 66). Drugi opet pokazuju višestruke promene u mitohondrijama. Fenotip tih "dvostrukih" nuklearnih mutanata često je sličan citoplazmatičnim petit mutantima iako je mutacija na jednom nuklearnom genu.

Velik broj istraživača ispitivao je uticaj mutacije na jed. DNA, na biosintetsku sposobnost u mitohondrijama.

Šubik i saradnici (210) u svom radu povezali su broj citohroma u nuklearnom mutantu sa biosintetskom sposobnošću u mitohondrijama. Oni smatraju da nuklearni petit mutanti gubitkom samo jednog citohroma u mitohondrijama imaju biosintetsku sposobnost proteina a gubitkom više citohroma, gubi se i biosintetska sposobnost proteina u mitohondrijama.

Istraživanja Ebnera i saradnika (67) ukazuju da je povezanost biosinteze proteina u mitohondrijama sa fenotipom sadržaja citohroma u nuklearnim mutantima mnogo složenija.

Svi nuklearni mutanti koje su ovi autori ispitali imaju funkcionalnu sposobnost sinteze proteina na nivou mitohondrija, bez obzira na broj citohroma koji nedostaju. Medjutim, nekoliko proizvoda mitohondrijske proteinske sinteze je izmenjeno. Ovo bi moglo biti objašnjenje koje može pomiriti rezultate iz dva poslednja citata, koji su na izgled kontradiktorni. Ebner i saradnici (67) zaključili su da promene na jednom nuklearnom genu u nuklearnim petit mutantima sa višestrukim izmenama u mitohondrijskoj membrani zadržavaju sposobnost sinteze proteina na nivou mitohondrija. Ovaj fenotip ovih mutanata može biti odraz izmene ili gubitak hromozomskog koda "organizatora" proteina koji učestvuje u sastavljanju unutrašnje mitohondrijske membrane. Ovo može biti objašnjenje i za izmenu fosfolipida koje su uočene u mitohondrijskoj membrani (67).

3.2. Nuklearni petit mutanti u izučavanju biogeneze mitohondrija

Veliko interesovanje za biogenezu mitohondrija, poslednjih godina koncentrisano je na ulazak i vezivanje proteina u sastav mitohondrijske membrane (85, 87, 88, 89). Kao što je poznato većina proteina mitohondrijske membrane koordinirani su nuklearnim genima i sintetizovani na citoplazmatičnim ribozomima (85). Većina njih je sintetizovana kao veći prekursori, koji su proteolitičkim razlaganjem ušli u sastav membrane (90). Njihovo unošenje u membranu u nekim slučajevima zahteva energiju unutrašnje membrane mitohondrija (87,89). Uprkos intenzivnom istraživanju i nekoliko dobro okarakterisanih mitohondrijskih proteina (90), još uvek nema preciznih informacija o osnovnom ćelijskom mehanizmu kojim protein ciljno ulazi u mitohondrije i korektno se raspoređuje u jednom od četiri dela mitohondrija (spoljna membrana, medjumembranski prostor, unutrašnja membrana i matriks).

Na primer, poznato je nekoliko prekursorskih proteina, kako njihov aminokiselinski sastav, tako i njihova lokacija

(91, 92). Prekursorski proteini poznati su za citohrom c peroksidazu (91, 92), elongacioni faktor TU, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kao i za podjedinicu 9 ATP-aze iz *Neurospora crassa* (92).

Još uvek nema dovoljno eksperimentalnih podataka zašto dolazi do proširenja polipeptidnih lanaca (prekursora): da li zbog njihovog transporta ili ciljnog vezivanja u mitohondrijsku membranu.

Genetika omogućuje veoma efikasan način identifikacije specifičnih proteinskih sekvenci ili strukture koje su važne za ciljno vezivanje proteina u membrani. Mnoge skladne studije u kojima su upotrebljeni spojeni proizvodi gena i dirigovana mutagenaza, upotrebljeni su za ispitivanje ciljnog vezivanja proteina u sastav membrane (93, 94). Ovaj prilaz takodje se može primeniti u ispitivanju mitohondrijske biogeneze *S. cerevisiae*, kada su dostupne mutacije strukturnih gena i klonirani geni za mitohondrijske proteine (85).

Kvaščeva citohrom oksidaza je heterooligomerni protein smešten u unutrašnjoj membrani mitohondrije. Ovaj enzim ima devet podjedinica od kojih su podjedinice I, II i III kodirane mit. DNA (95, 96, 97) dok su podjedinice IV, V, VI, VII, VIIa i VIII kodirane jed. DNA (98, 99, 100). Jednom kodirane podjedinice su biohemijski definisane i poznata je potpuna ili delimična aminokiselinska sekvenca za svaku podjedinicu (100). Pošto su nuklearni petit mutanti deficijentni u citohrom c-oksidazi, mogu se izolovati i odrediti. McEwen i saradnici (85) izolovali su nuklearni mutant koji ne sadrži strukturni gen za podjedinicu V citohrom c-oksidaze. U ovaj mutant kloniran je gen za podjedinicu V citohrom oksidaze. Nakon kloniranja iz ćelija mutanta izolovana je podjedinica V i određena je njena relativna molska masa (M_r) koja iznosi 13500 u poredjenju sa M_r iz divljeg soja koja iznosi 12500, što pokazuje da se podjedinica V posttranslaciono menja.

Za ovakva istraživanja izuzetno su pogodni nuklearni petit mutanti indukovani temperaturom (77).

3.3. Proteinski sastav membranskog sistema mitohondrija

Termin mitohondrija uveo je Bende (101) za pojedine granule u ćelijama čija funkcija u to vreme nije bila poznata. U periodu 1900-1930. godina, bilo je zapaženo da svi aerobni organizmi poseduju takvu vrstu granula, koje je Bende označio mitohondrijama. Radovi Keilina (102) prvi su ukazali na važnu ulogu sistema citohroma u aerobnim ćelijama, zatim slede radovi Warburga i Negeleina (103), koji su našli da se ugljenmonoksid vezuje za "Atmungsferment", danas poznat kao hem a_3 citohrom oksidaze. Zahvaljujući radu Krebsa i Johnsona (104), godine 1930. otkriven je ciklus trikarbonskih kiselina, koji je i danas poznat kao Krebsov ciklus, a povezan je sa dobivanjem velike količine ATP-a, koja se dobiva oksidacijom pojedinih intermedijera ovog ciklusa. Uvodjenjem saharoznog medijuma, pogodnog za izolovanje mitohondrija, Hageboom i saradnici (105) pokazali su da se oko 80% sukcinat oksidazne aktivnosti nalazi u mitohondrijama. Nekako u isto vreme dokazano je da su mitohondrije organele u kojim je smešten i Krebsov ciklus, te da su one centar energetskog metabolizma. Kasnije, uvodjenjem elektronske mikroskopije, analizirana je struktura mitohondrija elektronskom mikroskopijom.

Velik napredak u izučavanju mitohondrija predstavljao je rad Paladea (106) koji je opisao prisustvo dvomembranskog sistema u mitohondrijama. Rad Fernandez-Morana (107) pokazao je da se negativnim bojenjem može dokazati da unutrašnja mitohondrijska membrana, pored linearnog protezanja, poseduje i kvržice prečnika od 9 nm. Ove delove su kasnije prepoznali Racker i saradnici (108) kao morfološki deo koji pripada ATP-azi i označen je kao F1.

Napretkom spektroskopije i tehnike razdvajanja mitohondrija, informacije o strukturi i funkciji mitohondrija su porasle, naročito radovima Mitchella (109-113), koji je predložio hemostatsku koncepciju oksidativne fosforilacije. Uvodjenje SDS-poliakrilamid gel-elektroforeze (114) i upotreba deterdženata za dobro razlaganje proteina mitohondrija,

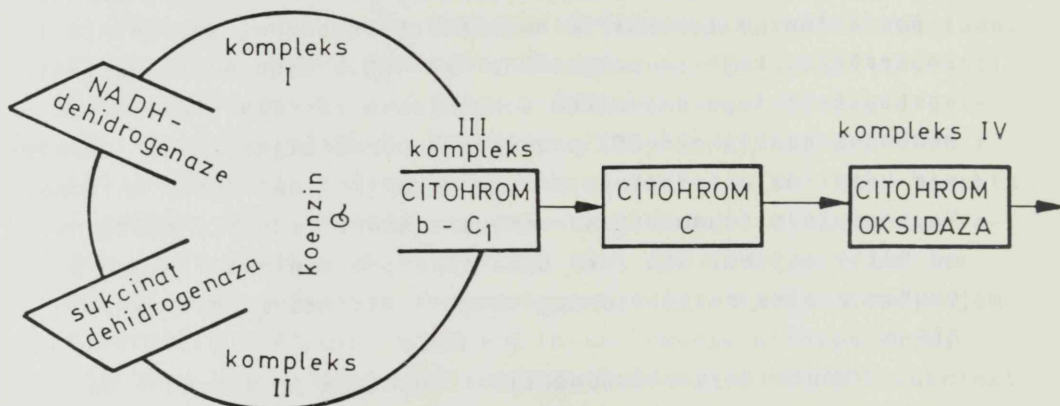
postali su dobri instrumenti za direktno prepoznavanje odgovarajućih delova mitohondrija na molekulskom nivou.

Noviji rezultati o organizacionoj shemi i osobinama mitohondrija prikazani su u monografijama (115-117). U njima su rezultati i saopštenja o multienzimskim kompleksima odgovornim za transformaciju oksidativne energije, zatim delovi metaboličkog puta nekih aminokiselina, masnih kiselina i porfirina. Mitohondrije sadrže dve membrane, spoljašnju i unutrašnju, koje se medjusobno razlikuju kako po propustljivosti, tako i po enzimskom i hemijskom sastavu. Spoljašnja membrana sadrži oko 50% proteina i permeabilna je za jedinjenja koja imaju relativnu molsku masu (M_r) oko 10000 daltona. Unutrašnja mitohondrijska membrana sadrži oko 67% proteina, od kojih najveći deo (oko 80%) čine proteini koji ulaze u sastav enzima respiratornog lanca i sistema za stvaranje ATP-a.

Unutrašnja mitohondrijska membrana je suprotna od spoljašnje, manje je permeabilna, ali zato pored enzima lanca disanja sadrži veliki broj transportnih sistema: H^+ , ATP, ADP, Pi, dikarbonske kiseline, trikarbonske kiseline, aspartat, malat, glutamat, Ca^{2+} , i Na^+ . Glavna uloga Krevsovog ciklusa je oksidacija piruvata (acetil-CoA), dobivenog tokom glikolize do CO_2 i dobivanje tim procesom NADH i $FADH_2$. Respiratorni lanac prenosi redukcione ekvivalente od NADH i $FADH_2$, preko multienzimskih kompleksa (kompleks I, II, III, IV) prema njihovim redoks-potencijalima do kiseonika (slika 3). Različiti delovi respiratornog lanca su identifikovani i razdvojeni upotrebom specifičnih inhibitora. Tako je kompleks V, tj. ATP-sintetaze izolovan i definisan, što je detaljno opisano u radovima 118 i 119.

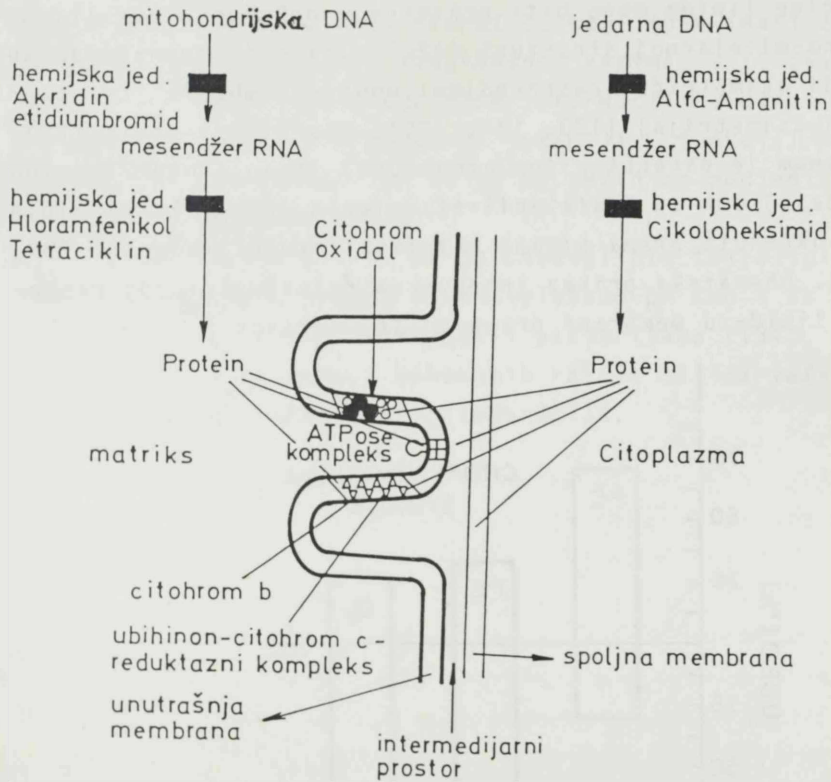
Prema prethodnoj teoriji hemostatskog kuplovanja respiratornog lanca i ATP-sintetskog kompleksa, koju je predložio Mitchell (109-113), smatra se da se atomi vodonika prenose iz matriksa mitohondrija u citosol preko asimetrično raspoređenih komponenti respiratornog lanca u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Time se uspostavlja elektrohemijski

potencijal unutrašnje membrane, koji čine pH-gradijent i električni potencijal. Energije oba sistema korišćene su za fosforilaciju ADP-a i transport jona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu.



Slika 3 - Shematski prikaz respiratornog lanca prema Ruĳtinbeku (120)

Na slici 4 dat je shematski prikaz nekih delova koji čine unutrašnju mitohondrijsku membranu prema Grivellu i saradnicima (121). Na shemi osim topografije multienzimskih kompleksa (I, II, III, IV i V) u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, prikazano je i mesto sinteze podjedinica koje ulaze u njihov sastav.

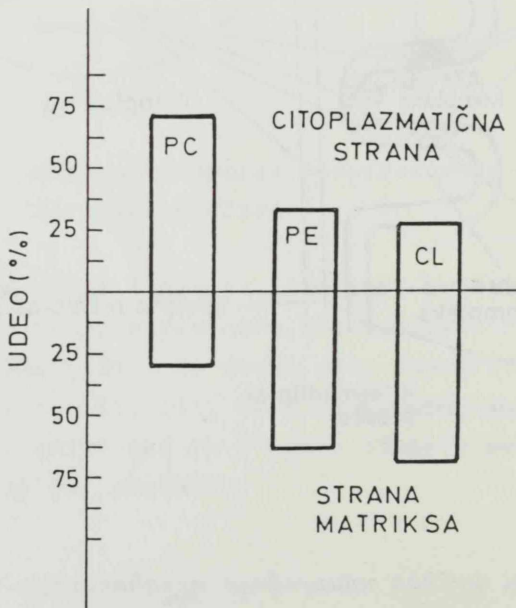


Slika 4 - Shematski prikaz unutrašnje mitohondrijalne membrane prema Grivell-u (121)



3.4. Lipidni sastav mitohondrijske membrane

U unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani nalazi se između 0,24 i 0,44 mg lipida na mg proteina. Većinu ovih lipida čine fosfolipidi, koji su uglavnom smešteni u središnji deo membrane, između dva proteinska sloja. Male količine lipida mogu biti prisutne u heksagonalnoj ili povratno-micelarnoj strukturi (122). Inače je poznato da su lipidi asimetrično raspoređeni unutar membrane (transverzalna asimetrija) (123, 124, 125). Fosfatidil-holin (PC) uglavnom je okrenut citoplazmatičnoj strani (oko 73% svog sadržaja) dok su fosfatidil-etanolamin (PE) i kardiolipin (CL) okrenuti prema strani matriksa (oko 62% odnosno 73%) (123). Shematski prikaz transverzalne asimetričnog rasporeda lipida u membrani prikazan je na slici 5.



Slika 5 - Asimetrija fosfolipida u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani (125)

Transverzalni raspored CL može imati važnu ulogu u regulaciji nekih enzima i transportnih proteina, pošto je nadjeno da je CL tesno vezan za kompleks V (ATP-sintetski kompleks), citohrom oksidazu kao i da ima esencijalnu ulogu u translokacionoj katalizi Pi (127).

Prema Ernsteru i saradnicima (127), "drška" ATP-aznog sintetskog kompleksa sadrži CL koji može imati značajnu ulogu u funkciji tog kompleksnog enzima. U slučaju citohrom oksidaze, ima mnogo više informacija o ulozi CL ali tačnih podataka o njegovoj lokaciji i funkciji nema (128-130). Ima indikacija da je CL vezan za podjedinicu I citohrom oksidaze (130).

Kad se ima u vidu da je cardiolipin fosfolipid koji ima dva negativna naboja na fiziološkom pH kao i da je prisutan samo u mitohondrijama i bakterijama (131), može se zaključiti na osnovu pomenutih radova da ima važnu ulogu u biološkoj aktivnosti mitohondrija.

III. MATERIJAL I METODE

1. PRIPREMA I UPOTREBA ĆELIJSKIH KULTURA

Svi eksperimenti opisani u ovom radu izvedeni su sa sojevima *Saccharomyces cerevisiae*, po kriterijumu da vode poreklo od proizvodnih kultura. Kulture šifrirane kao R-A, R-M i R-1 su iz zbirke kultura mikrobiološkog odeljenja Instituta "Servo Mihalj" u Zrenjaninu.

Kulture su čuvane na sladnom agaru. Pre ogleda kulture su pasažirane tri puta na 2% GKEP (20g/l glukoza, 10g/l pepton, 5g/l kvasni ekstrakt i 20g/l agara) (132).

Uticaj benomila i izazivanje petit mutanata od strane Vrbaške i saradnika (8) izvedeno je na sledeći način: suspenzija kvasca (0,1 ml) koja je sadržala $8-10 \cdot 10^5$ ćelija, razvlačena je po površini hranljive podloge 2% GKEP, koja je sadržala $7-10^{-3}$ mg/ml benomila. Kulture su gajene na 28°C za kontrolne uzorke, a pet dana za tretirane uzorke. Razvijene kolonije u petri šoljama preli-vene su svežim rastvorom 2,3,5-trifenil tetrazolijum hloridom masene koncentracije 1g/l. Dva do tri sata nakon toga uočavaju se dve vrste kolonija - bele i crvene. Prema metodi Ogure (9), bele kolonije pripadaju petit ćelijama a crvene divljem soju pekarskog kvasca. Petit mutanti pikirani su iz malih belih kolonija u tečnu podlogu (20g/l glukoza, 10g/l pepton i 5g/l kvasni ekstrakt). Posle gajenja na 28°C, izolati su čuvani u frižideru i označeni kao RD-1, RD-A i RD-M.

Za biohemijska istraživanja, ćelije pekarskog kvasca (R i RD) gajene su na tečnoj podlozi po Loderu (132), na temperaturi 28°C, 24 sata sa i bez aeriranja (semiaerobni uslovi) vazdušnom pumpom snage motora od 4 W. Ćelije su gajene do stacionarne faze, nakon čega su odvajane od podloge centrifugovanjem na 4°C na 1000 g, 10 minuta na centrifugi Sorvall RC-58.

Nakon odvajanja od tečne podloge, ćelije su oprane tri puta u 20 mmol/l Tris-HCl puferu, pH 7,2.

2. MERENJE RESPIRACIJE ĆELIJA KISEONIČNOM ELEKTRODOM

Ćelije pekarskog kvasca, pripremljene na prethodno opisan način, upotrebljene su za merenje sposobnosti usvajanja kiseonika, pomoću Clarkove kiseonične elektrode.

2.1. Merenje brzine endogene respiracije ćelija pekarskog kvasca

Suspencije ćelija pekarskog kvasca (20 ml) masene koncentracije 20 mg/ml inkubirane su u medijumu 100 mmol/l Tris-HCl, pufera pH 7,35 sa prethodnom aeracijom ili bez nje. Aeriranje je izvedeno pomoću vazdušne pumpe u trajanju 120 min. na 20°C. Tako pripremljene ćelije bile su dodavane u alikvotima 0,05-0,2 ml u elektrodnu komoru, volumena 1 ml.

2.2. Odredjivanje prividne K_m i V_{max} ćelija *petit mutanata* pekarskog kvasca prema glukozi

Suspencije ćelija (20 ml) masene koncentracije 20 mg/ml inkubirane su u medijumu 100 mmol/l fosfatni pufer pH 6,0 120 minuta uz aeriranje vazdušnom pumpom na 20°C. Nakon inkubiranja, suspenzija ćelija je prenetu u elektrodnu komoru, gde je krajnja koncentracija iznosila 10 mg/ml. Brzina respiracije praćena je pri rastućoj koncentraciji glukoze od 0,01 do 10 mmol/l. Brzina respiracije merena je Clarkovom kiseoničnom elektrodom, čime je ujedno omogućeno da se jedinice brzine izraze kao $\mu\text{mol O}_2 \text{l}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Primenom grafičke metode Lineweaverovog i Burkovog grafikona određeni su kinetički parametri K_m i V_{max} celih ćelija pekarskog kvasca.

3. PRIPREMA ĆELIJSKOG HOMOGENATA

Ćelije pekarskog kvasca razbijene su mehaničkim putem u Braunovom MSK homogenizeru, uz hladjenje tečnim CO_2 . Sveže oprane ćelije pekarskog kvasca (od 4 do 5 g sa 25% suve mase) mešane su sa izolacionim medijumom (4-5 ml) i suspenzija homogenizirana u Braunovom MSK homogenizeru dva puta po 15 sec. pri brzini od 4000 $^{\circ}/min$ uz dodatak staklenih perli (25 g prečnika oko 0,18-0,20 mm). Dobiveni homogenat je od staklenih perli odvojen sedimentacijom. Nakon sedimentacije perle su oprane još dva puta sa po 10 ml izolacionog medijuma. Priprema ćelijskog homogenata izvedena je upotrebom dva izolaciona medijuma: hipotoničnog (HTM) i izotoničnog (ITM) u zavisnosti od cilja dalje upotrebe homogenata. Hipotonični medijum (HTM) sastava 15 mmol/l Tris -HCl, pH 7,2 i 1 mmol/l EDTA, upotrebljen je za kompletno razbijanje ćelija i ćelijskih organela u cilju određivanja: 1. enzimске aktivnosti glikolitičkih enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze, EC(1.1.1. 49) i heksokinaze EC(2.7.1.1.), 2. za razdvajanje ćelijskih proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom.

Izotonični medijum (ITM) sastava 15 mmol/l Tris-HCl pH 7,2; 0,6 mol/l sorbitola i 1 mmol/l EDTA upotrebljen je da se razbije samo ćelijski zid kvasca, a da ćelijske organele budu očuvane. Ovakav homogenat je bio dalje upotrebljen za izolaciju mitohondrija (133).

U oba slučaja dobiveni homogenati su sadržali još celih i napuklih ćelija. Njihovo razdvajanje od ćelijskog homogenata izvedeno je centrifugovanjem na Sorvallovoj centrifugi sa hladjenjem na 1200g 10 minuta.

3.1. Razdvajanje izoenzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze EC(1.1.1.49) i heksokinaze EC(2.7.1.1) blok elektroforezom na poliakrilamidnom gelu

Nativnom poliakrilamidnom gel elektroforezom razdvojeni su izoenzimi glukoze-6-fosfat dehidrogenaze i heksokinaze iz ćelijskog homogenata (primenom hipotoničnog izolacionog medijuma - HIM). Elektroforeza je izvedena modifikacijom O'Farrellove (134) metode na pločastom gelu. Pločasti gel debljine 1 mm, sastojao se od gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. *Gel za razdvajanje* sastojao se od 100g/l akrilamida, 2,3g/l N,N'-metilenbisakrilamida, 0,375 mol/l Tris-HCl pufera pH 8,8, 0,33g/l amonijum-persulfata i 0,05%(v/v) TEMED. *Gel za koncentrovanje* visine 25 mm sadržao je 47,5g/l akrilamida, 1,20g/l N,N'-metilenbisakrilamid i 0,125 mol/l Tris-HCl, pH 6,8. *Elektrodni pufer* se sastojao od 0,025 mol/l Tris-a i 0,192 mol/l glicina pH 8,3.

Prethodno pripremljen gel postavi se u aparat za elektroforezu ručne izrade, kako je detaljno opisano u radu Kevrešana (154). Nakon izvršene predelektroforeze, stavljeni su uzorci proteina. Za elektroforezu naneto je 50 ug proteina i 3 ul 1g/l bromfenol plavog po uzorku. Da bi uzorci bili specifično gušći od elektrodnog pufera, su prethodno pomešani sa glicerolom, tako da je masena koncentracija glicerola iznosila 100g/l. Elektroforeza je izvedena na +4°C, pet sati na 20 mA.

Nakon izvršene native elektroforeze, identifikacija razdvojenih izoenzimskih traka na gelu izvedena je bojenjem na aktivnost prema metodi Sauera (135).

Gel je nakon elektroforeze potopljen u 100 ml medijuma koji je sadržao 100 mmol/l Tris-HCl pufera pH 7,8 i sledeće sastojke masene koncentracije (mg/ml): glukoze-6-fosfat 0,25; NBT, 0,25; NADP, 0,25; MgCl₂ 0,1; EDTA 0,25 i PMS 0,01. Boja na gelu pojavljuje se nakon 30 minuta na sobnoj temperaturi, na mestu gde se nalaze izoenzimi

glukoze-6-fosfat dehidrogenaze.

Tako dobiveni elektroforetogram podvrgnut je denzitometrijskoj analizi na ISCO Gel Sceneru povezanom sa UA-5 monitorom, na talasnoj dužini 580 nm. Iz dobivenog denzitograma može se utvrditi broj i udeo pojedinih izoenzima.

Da bi se utvrdio broj izoenzima heksokinaze, gel se posle elektroforeze potapa u 100 ml medijuma koji je sadržao 100 mmol/l Tris-HCl pufera pH 7,8 i sledeće sastojke masene koncentracije (mg/ml): glukoza 2, $MgCl_2$ 0,1, NBT 0,2, NADP 0,25 : ATP 0,5 : PMS 0,1. Reakcija je izazvana dodavanjem indikator enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u količini 100 IJ. Nakon 30 minuta na sobnoj temperaturi, javljaju se ljubičaste trake na gelu koje potiču od izoenzima heksokinaze.

3.2. Odredjivanje aktivnosti enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze EC(1.1.1.49) i heksokinaze EC(2.7.1.1)

Aktivnost ova dva enzima odredjena je prema Bergmyeru (136), spektrofotometrijskom, kontinualnom test-metodom. Homogenat (30-40 ml) dobiven nakon primene HTM medijuma, dalje je bio centrifugovan na 20.000 g 20 minuta na $+4^{\circ}C$ na centrifugi Beckman model JB-21. Dobiveni talog je odbačen, a supernatant je taložen zasićenjem sa amonijum sulfatom do 80%, dobiveni talog je odvojen centrifugovanjem i rastvoren u 20 mmol/l Tris-HCl puferu, pH 7,5.

3.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina ćelijskog homogenata i mitohondrija

Elektroforetsko razdvajanje proteina izvedeno je prema metodi O'Farrella (134), primenom SDS poliakrilamidne gel elektroforeze. Izvedena je jednodimenzionalna SDS-elektroforeza, pri čemu je razdvajanje proteina izvršeno prema molskim masama. Distribucija razdvojenih proteina po molskim

masama određena je prema standardnim supstancama poznatih relativnih molskih masa (citohrom c, 12400, tripsin inhibitor iz soje 20.000, albumin iz jajeta 45.000 i govedji serum albumin 67.000).

Priprema uzorka ćelijskog homogenata za elektroforetsko razdvajanje izvedena je prema metodi Naggerta (155). Ćelijski homogenat je solubilizovan u rastvoru koji je sadržao 100 g/l glicerola 0,5%(v/v) 2-merkaptioetanol, 25 g/l SDS. Tako dobiven uzorak zagrevan je na 100°C 1-2 minuta. Za elektroforezu naneto je 50 µg proteina na gel koji je pripremljen na prethodno opisan način. Izuzetak je što elektrodni pufer kao i puferi koji ulaze u sastav gela sadrže 1 g/l SDS-a. Na isti način je izvedena elektroforeza mitohondrijskih proteina. Talog mitohondrija, izolovan po metodi Cabona i saradnika (133), resuspendovan je u medijumu sledećeg sastava: 62,5 mmol/l Tris-HCl puferu pH 6,8 u kojem se nalazio sorbitol koncentracije 0,6 mol/l, i zapreminski udeo 2-merkaptioetanol 0,5% (v/v) i 25,0 g/l SDS (155).

Bojenje razdvojenih proteina vršeno je sa Comassie Brilliant Blue R-250. Gelovi, posle elektroforeze, potopljeni su u rastvor koji je sadržao 2 g/l Comassie Brilliant Blue R-250, i zapreminski udeo: etanola 50% i sirćetne kiseline 10%. Bojenje traje oko dva sata, posle čega se boja odvađa višestrukim ispiranjem rastvorom za obezbojavanje. Rastvor za obezbojavanje sastojao se od zapreminskog udela: sirćetne kiseline 7% i 6% metil-alkohola.

Denzitometrijska analiza gelova obojenih sa Comassie Brilliant Blue R-250, izvedena je na ISCO Gel Sceneru povezanim sa UA-5 monitorom, na talasnoj dužini 580 nm. Iz dobivenih denzitograma udeo pojedinih frakcija određen je planimetrijski.

4. KVANTITATIVNO ODREĐJIVANJE CITOHROMA U INTAKTNIM ĆELIJAMA PEKARSKOG KVASCA

Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca određen je u osnovi po metodi Oure i Suomalainena (137), sa izvesnom modifikacijom. Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama kvasca određen je spektrofotometrijski iz prethodno pripremljene ćelijske paste kvasca. Pasta kvasca se priprema na sledeći način: odmeri se 1 g sveže mase kvasca (sa 25% suve mase) i resuspenduje se u 10 ml 20 mmol/l fosfatnog pufera pH 5,6 koji sadrži i 10 mmol/l KCl i 1,62 mmol/l $MgSO_4$. Kvasac se zatim redukuje dodavanjem 10 mg ditionita ($Na_2S_2O_4$) u suspenziju kvasca. Redukcija traje 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon izvršene redukcije ćelije kvasca se odvajaju po metodi Oure i Suomalainena (137) filtriranjem na "Pyrex-glass" filtru No 4. Medjutim, mi smo ćelije kvasca odvajali centrifugovanjem na 28.000 g 10 minuta u centrifugi Beckman JB-21. Dobivena ćelijska pasta prenetu u kivetu sa optičkim putem 0,2 cm. Kao slepa proba služe određena količina i boja transparentnog papira. Autori metode predlažu da se držač za uzorke u spektrofotometru što je moguće više približi fotomultiplikatoru, što obično zahteva konstrukcijsku adaptaciju spektrofotometra. Posle pripreme koja je opisana za snimanje paste upotrebljen je Zeiss UV-VIS Specord bez adaptacija. Pri snimanju spektra (400-650 nm) nula aparata je bila podešena na 650 nm. Iz dobivenih spektara odbije se apsorpcija nespecifičnog porekla, kod apsorpcionih traka koje se posmatraju.

Za izračunavanje sadržaja citohroma upotrebljeni su apsorpcioni molarni koeficijenti poznati u literaturi (137). Nakon izračunavanja sadržaja pojedinih citohroma, izračunate su vrednosti pojedinih citohroma izražene u molovima na litar kvasca sa 25% suve materije (137).

5. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA ČESTICA ZA TRANSPORT ELEKTRONA

Izolovanje čestica za transport elektrona (ETP-čestice) izvedeno je prema metodi Macklera (139). Čelije kvasca su razbijane u izotoničnom medijumu (ITM) na način koji je opisan na strani 24 za dobivanje ćelijskog homogenata. Tako dobiven homogenat (oko 30 ml) dalje je centrifugovan na 43.000 g 30 minuta na centrifugi Beckman JB-21. Dobiveni bistar supernatant (S1) odvoji se a talog (R1) je resuspendovan u (10 ml) izotoničnog medijuma (0,6 mol/l sorbitola, Tris-HCl, 15 mmol/l, pH 7,2 i 1 mmol/l EDTA). Tako resuspendovan talog izložen je ultrazvuku pomoću aparata Biosonik, žuta glava, 10 minuta. Nakon ovog tretmana, dobivena suspenzija je dovedena na pH 10 sa KOH (6 mol/l) i centrifugovana na 43.000 g 30 minuta. Posle centrifugovanja zapažaju se tri sloja: bistri rastvor koji je odvojen, zatim mrkocrveni talog koji je pokretljiv, i čvrsto pakovan talog koji se odbacuje. Srednji sloj taloga, mrkocrveni, sakupljen je i resuspendovan u 5 ml izolacionog medijuma i sa 0,1 mol/l HCl doveden na pH 8,5. Ovako dobivena suspenzija centrifugovana je 10.000 g 20 minuta i dobiveni zamučeni supernatant je recentrifugovan na 43.000 g 90 minuta. Krajnji talog predstavlja "ETP"-čestice pa je resuspendovan u 0,5 ml izotoničnog izolacionog medijuma pH 7,2. Tako dobivena suspenzija sadrži oko 15 mg/ml proteina, koji je odredjen Lowryjevom metodom (153).

Karakterizacija izolovanih "ETP"-čestica vršena je spektrofotometrijski, elektronskim mikroskopom i Mahlerovim kriterijumom.

1. Karakterizacija "ETP"-čestica spektrofotometrijski izvedena je prema metodi Macklera (139): dobivene "ETP"-čestice redukovane su ditionitom ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) i snimljen je diferencijalni spektar između redukovanih i nereduovanih "ETP"-čestica. Diferencijalni spektri snimljeni su na spektrofotometru Zeiss, UV-WIS, Specord, na sobnoj temperaturi u kivetama od 0,2 cm. U 0,1 mol/l fosfatnom puferu pH 7,5

resuspendovano je 3 mg proteina u 0,5 ml datog pufera.

2. Karakterizacija "ETP"-čestica elektronskim mikroskopom metodom Kapi (126): kap-suspenzija "ETP"-čestica koncentracije 9 mg/ml proteina preneti je na parafilm sa koje je skinuta mrežicom i osušena na vazduhu. Nakon toga mrežica je isprana destilovanom vodom, osušena i bojena 1% rastvorom fosfovolframovom kiselinom. Mikroskopiranje je izvedeno na elektronskom mikroskopu JEM-100 c (JEOL).

3. Karakterizacija "ETP"-čestica odredjivanjem Mahlerovog kriterijuma: Mahlerov kriterijum (138) predstavlja odnos specifičnih aktiviteta NADH-oksidadze iz taloga (R_1) i supernatanta (S_1), koji je dobiven nakon prvog centrifugovanja na 43.000 g u toku 30 minuta pri izolovanju "ETP"-čestica. Na isti način iz pomenutog taloga (R_1) i supernatanta (S_1) koristi se odnos specifičnih aktiviteta NADH citohrom-c-reduktaze.

Aktivnost NADH oksidadze odredjena je prema metodi Macklera (139) spektrofotometrijski. Test-sistem za odredjivanje ovog enzima sadrži: 0,1 mmol/l NADH, 0,04 mol/l fosfatnog pufera pH 7,5 i 0,02% citohrom c. Reakcija je započeta sa oko 4 μ g proteina, R_1 i S_1 frakcije. Tok reakcije praćen je na 340 nm, kontinualnim testom.

Aktivnost NADH-citohrom-c-reduktaze odredjena je spektrofotometrijski po metodi Macklera (139). Test smesa za odredjivanje aktivnosti NADH-citohrom-c-reduktaze sadrži: 0,1 mmol/l NADH, 0,04 mol/l fosfatnog pufera pH 7,5, 0,01 mol/l natrijum azida i 0,1% citohrom c. Reakcija je započeta dodavanjem enzima iz R_1 i S_1 frakcije i kontinualno praćena na talasnoj dužini 550 nm.

6. ANALIZA LIPIDA U ĆELIJAMA PEKARSKOG KVASCA

Analiza lipida izvršena je iz ekstrakta ćelija pekar-skog kvasca po modifikovanoj metodi Folcha (140). Sveže oprani mikroorganizmi (4 g sa 25% suve mase kvasca) su pomešani sa metanolom (40 ml) i suspenzija mešana u Braunovom MSK

homogenizeru, 30 sec, pri brzini 4000 o/min, uz dodatak staklenih perli (60 g, prečnika d 0,18-0,20 mm). Nakon razbijanja, dodat je hloroform (dve zapremine u odnosu na prethodno dodat metanol), i tako dobivena suspenzija mešana je još dva sata na sobnoj temperaturi. Suspenzija je filtrirana kroz filter-papir Whatman No 44 i zatim je ekstrakciona procedura ponovljena još jednom na ostatak materijala. Oba dobivena ekstrakta su spojena i oprana sa 0,25 zapremine 8,8 g/l KCl. Smeša je razdvojena centrifugovanjem ili stajanjem preko noći na +4°C. Donja hloroformska faza je odvojena, uparena na rotacionom vakuum uparivaču i talog je odmah rastvoren u 2 ml smeši hloroforma i metanola zapreminskog odnosa 2:1. Uzorci su čuvani pod strujom azota na -20°C.

Iz dobivenog ekstrakta odredjen je sadržaj neutralnih lipida, fosfolipida i sadržaj masnih kiselina.

Neutralni lipidi iz ekstrakta lipida odvojeni su na pločama (0,4 mm) Silica gela GF₃₆₆₊₂₅₄, upotrebom sistema razvijača petroletar / etar / sirćetna kiselina u zapreminskom odnosu: 70:30:2. Lipidi su izazvani izlaganjem ploča parama joda (158) i pod UV-lampom. Mrlje su kvantitativno uklonjene sa ploča i njihov sadržaj odredjen bihromatskom reakcijom (157).

Analiza fosfolipida iz ekstrakta lipida izvedena je hromatografijom, na tankom sloju na pločama, Silica gel H (0,5 mm), upotrebom sistema razvijača hloroform / metanol / sirćetna kiselina / voda u zapreminskom odnosu (25:15:4:2) prema Skipskom (141). Vrste lipida izazvane su parama joda (158) a položaj mrlja zabeležen je iglom. Fosfolipidi su identifikovani prema referentnim supstancama, koje su se razvijale simultano. Upotrebljena procedura ne daje potpuno razdvajanje fosfatidil-serina i fosfatidil-inozitola (142).

Analitički je odredjen sadržaj lipidne mrlje preko sadržaja fosfora (156) i bihromatskom metodom (157).

Sadržaj masnih kiselina odredjen je iz ekstrakta lipida (140), nakon hidrolize sa 0,5 mol/l metanolskog rastvora NaOH, i izvršene esterifikacije u metil-estre, koji su zatim ekstrahovani u heksanu. Metil-estri masnih kiselina su razdvojeni

gasnom hromatografijom. Gasna hromatografija je izvedena na koloni (2 m) 15% EGSSY na temperaturi 175⁰C. Iniciranje uzorka je bilo na 210⁰C u struji azota brzine 40 ml/min. Procen-tni udeo masnih kiselina odredjen je denzitometrijski a vrste masnih kiselina utvrdjene su preko retencionih vremena upore-djenih sa standardnim supstancama.

Dvodimenzionalna hromatografija fosfolipida na tankom sloju. Fosfolipidi su razdvojeni prema metodi Chapmana i Robertsona (143) dvodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju, upotrebom tri sistema razvijača na pločama Silica gela G 60 (0,25 mm debljine). Na ploče je naneto 100 μ l ekstrakta dobivenog po modifikovanoj metodi Folcha (140). Iz 1 g suve mase kvasca dobiveno je 1,25 ml lipidnog ekstrakta.

Hromatografija je izvedena na pločama dimenzija 20 x 20 cm razvijenim u hloroformu do 14 cm visine ploče. Nakon su-šenja u istom pravcu vršeno je razvijanje hromatograma do 10 cm u rastvaraču: hloroform / metanol / 7 mol l⁻¹ amonijum hidroksida (65:30:4). Zatim je hromatogram sušen na vazduhu oko 30 minuta i nakon toga je razvijena druga dimenzija u sledećem sistemu razvijača: hloroform / metanol / sirćetna ki-selina / voda u zapreminskom odnosu: 170:25:25:4. Fosfolipidi, kao i drugi lipidi, bili su izazvani bojenjem sa parama jo-da (158).

Dobivene mrlje dokazane su na osnovu standardnih sup-stanci (PC - fosfatidil-holin; PE - fosfatidil-etanolamin; CL - cardiolipin) i specifičnim bojenjem. Specifično bojenje izvedeno je na osnovne hemijske komponente koje ulaze u sa-stav fosfolipida, kao na primer Dragendorfov reagens (159) za holinsku komponentu u PC, ninhidrinski reagens (159) spe-cifičan za primarne amine, koji ulaze u sastav PE i PS. Dokazivanje celokupne klase fosfolipida izvršeno je amonijum molibdatom (karakteristična reakcija na fosfatnu grupu).

Kvantitativni sadržaj fosfolipida po razdvojenim frak-cijama odredjen je tako da su mrlje kvantitativno skinute sa ploče i prenete u epruvete gde je izvršena bihromatska metoda (157) i metoda analize preko fosfora (156). Iz kalibracionih

krivih izračunat je sadržaj fosfolipida.

6.1. Ekstrakcija fosfolipida iz mitohondrija

Ekstrakcija fosfolipida iz mitohondrijske frakcije izvedena je prema metodi Bligha i Dyera (144). Na mitohondrijsku frakciju od 1 ml (koja sadrži 10 mg proteina), dodato je 3,75 ml rastvarača (metanol/hloroform u zapreminskom odnosu 2:1). Ekstrakcija je vršena 10 minuta uz blago mešanje, na sobnoj temperaturi. Nakon stajanja od deset minuta, proteinski talog odvojen je centrifugovanjem. Dobiveni talog ponovo je resuspendovan u 1 ml vode a procedura ekstrakcije je ponovljena. Na kombinovane ekstrakte na kraju je dodato 2,5 ml vode i 2,5 ml hloroforma. Ovako dobiven ekstrakt se snažno meša oko 30 minuta. Faze su razdvojene stajanjem preko noći na +4°C. Gornja faza je odbačena a donja hloroformska uparena. Lipidni ostatak je rastvoren u 1 ml hloroforma i pod strujom azota čuvan na -20°C. Ovako pripremljen ekstrakt razdvajan je dvodimenzionalnom hromatografijom po metodi Chapmana i Robertsona (143) i jednodimenzionalnom hromatografijom prema metodi Muellera (161).

Razdvajanje mitohondrijskih lipida prema metodi Muellera. Fosfolipidi iz mitohondrija ekstrahovani po metodi Bligha i Dyera (144), razdvojeni su jednodimenzionalnom hromatografijom (Silica-gel 60 F₂₅₄) upotrebom rastvarača hloroform / metanol / voda u zapreminskom odnosu 65:25:4, kao sistemom za razdvajanje. Mrlje su izazvane parama joda i identifikovane preko Rf vrednosti standardnih supstanci. Mrlje su mehanički kvantitativno skidane sa ploča i sadržaj fosfora iz njih odredjen je po metodi Harrisa i Popata (156).

7. IZOLOVANJE MITOHONDRIJA IZ ĆELIJA PEKARSKOG KVASCA

Mitohondrije ćelija kvasaca izolovane su prema modifikovanoj metodi Cobona i saradnika (133). Ćelije pekarskog kvasca razbijene su mehaničkim putem u Braunovom MSK homogenizeru u izotoničnom medijumu. Način razbijanja kao i odvajanja celih ćelija opisan je u metodama (vidi stranu 24). Primenom diferencijalnog centrifugovanja razdvojene su organele iz ćelija pekarskog kvasca. Dobiveni homogenat u izotoničnom medijumu centrifugovan je na 3.000 g 10 minuta. Dobiveni talog sadrži jedra i napukle ćelije pekarskog kvasca, i talog je odbačen, a supernatant je sačuvan. Daljim centrifugovanjem supernatanta na 12.000 g 10 minuta, dobivaju se u talogu sirove mitohondrije. Supernatant je zatim centrifugovan na 18.000 g 20 minuta, pri čemu je u talogu izdvojena lipozomalna frakcija (l). Iz dobivenog supernatanta, centrifugovanjem na 27.000 g 40 minuta, izdvojena je mikrozomska frakcija (p). Dobiveni talog predstavlja mikrozomsku frakciju (p), a supernatant solubilnu frakciju (s).

Sirove mitohondrije dalje su prečišćavane pranjem u izolacionom medijumu. Talog dobiven pri prečišćavanju mitohondrija (4.000 g 10 minuta), označen je kao frakcija T₃ i dalje je ispitivan zbog ukupnog bilansa proteina i analize enzima po metodi De Duvea (145).

Posle ovog pranja mitohondrije su staložene na 12.000 g 10 minuta i tako dobivene mitohondrije su dalje analizirane.

7.1. Karakterizacija mitohondrijske frakcije

Karakterizacija mitohondrijske frakcije utvrđena je primenom metode De Duvea (145) i elektronskim mikroskopom (147). Za dokazivanje mitohondrijske frakcije po metodi De Duvea upotrebljen je mitohondrijski marker enzim sukcinat dehidrogenaza. Prema metodi De Duvea određuje se relativni specifični aktivitet marker enzima ćelijskih organela. Relativni specifični aktivitet predstavlja odnos procenta aktivnosti(IJ) od ukupne aktivnosti ispitivanog enzima prema procentu proteina od ukupnog proteina ispitivanih frakcija.

Ukupni aktivitet u homogenatu ili zbir ukupnih aktivnosti po frakcijama (IJ), čini 100% ukupne aktivnosti, a aktivnost u frakcijama čini procentni udeo. Rezultati se predstavljaju histogramom. Najveći relativni specifični aktivitet je u frakciji čiji je marker enzim testiran.

Aktivnost sukcinat dehidrogenaze EC (1.3.99.1) određena je po metodi Arrigona i Singera (146), spektrofotometrijski. Test-sistem za određivanje ovog enzima sadrži: 40 mmol/l fosfatnog pufera pH 7,5, 0,25 mmol/l CaCl_2 , 0,4 mmol/l KCN, 0,013 mg/ml 2,6-dihlorindofenola i 1 mg/ml PMS i 16 mmol/l sukcinata. Kontinualnim testom merena je promena apsorpcije na 600 nm.

Karakterizacija mitohondrija elektronskim mikroskopom izvedena je prema metodi Veloursa i saradnika (147). Talog mitohondrija resuspendovan je u medijumu sledećeg sastava: 10 mmol/l Tris-HCl pufera pH 7,0, 0,6 mol/l sorbitola, 2,0 g/l BSA i 2,5% (v/v) glutaraldehida. U tom medijumu izvršena je prefiksacija u trajanju od 90 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon prefiksacije talog je odvojen centrifugovanjem na 20.000 g 20 minuta. Supernatant je odbačen a talog je u izotoničnom medijumu (kao medijum za prefiksaciju osim glutaraldehida) opran tri puta. Ovako opran talog izdvojen je i izvršena je postfiksacija u 1% (v/v) osmijumovoj kiselini, koja je rastvorena u 0,2 mol/l kokadilatnog pufera pH 7,0. Dobiveni talog je opran u 0,2 mol/l kokadilatnom puferu pH 7,0 i resuspendovan u 10 g/l uranil acetatu. Nakon dejstva sa uranil acetatom izvršena je dehidratacija i pakovanje u smoli Arladet. Ultratanki preseći izvedeni su u ultramikrotomu Reichert OMU 2 i kontrastirani.

Analiza morfologije celih ćelija kvasca elektronskim mikroskopom izvedena je na isti način.

8. ODREĐJIVANJE AKTIVNOSTI ADENOSINTRIFOSFATAZE EC (3.6.1.4)

Aktivnost adenosintrifosfataze EC (3.6.1.4) određena je kontinualnom spektrofotometrijskom metodom prema Cossonu i Spiridakisu (148). Osnovu ove metode čini povezanost promene pH, koja nastaje usled hidrolize ATP-a, promenom boje fenol reda, što se spektrofotometrijski može registrovati na talasnoj dužini 559 nm. Test smesa sadrži: 3,2 mmol/l $MgSO_4$, 4 mmol/l Tris-HCl pufer pH 8,4 i 0,16 g/l (m/v) fenol red. Krajnja zapremina test smese iznosila je 3 ml.

9. ODREĐJIVANJE SADRŽAJA NUKLEINSKIH KISELINA

Ekstrakcija nukleinskih kiselina iz ćelija pekarskog kvasca izvršena je prema metodama Ogura i Rosena (150) i Schmidta i Thannhausera (151). Određjivanje sadržaja nukleinskih kiselina vršeno je na bazi UV-spektrofotometrije. Apsorpcioni koeficijenti upotrebljeni su prema Lynnu i Smithu (162).

10. ODREĐJIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Za određivanje proteina upotrebljene su tri metode: po Bradfordu (152), Lowryju (153) i Kjeldahlu u aparatu KJEL-Foss.

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima bez SDS upotrebljena je metoda Lowryja (153). U uzorcima koji su sadržavali SDS primenjena je metoda Bradforda (152), koja ima prednost u odnosu na Lowryjevu metodu, jer prisustvo SDS-a nema uticaja na tačnost analize, a ozbiljne smetnje pravi Lowryjevoj metodi.

Za određivanje sadržaja proteina u celim ćelijama kvasca i homogenata pogodnija je metoda po Kjeldahlu, u

aparatu KJEL-Foss.

11. ODREĐJIVANJE AMINOKISELINSKOG SASTAVA PROTEINA

Analiza sadržaja aminokiselina radjena je na principu jonoizmenjivačke hormatografije, koju su postavili Moore i Stein (211).

Da bi se odredile aminokiseline, prethodno je izvršena hidroliza proteina (100 mg). Hidroliza uzorka izvršena je sa 6 mol/l HCl u približnom odnosu 1:500 (odnosno na 1 g proteina 500 ml kiseline), u vremenskom trajanju od 22 sata na temperaturi 110⁰C.

Hidrolizati su profiltrirani u odmerni sud i dopunjeni vodom do 100 ml. Od ovog osnovnog rastvora uzima se 20 ml i upari do suva, na rotacionom vakuum uparivaču, ispere se nekoliko puta vodom da se otkloni HCl, a suvi ostatak se rastvori u 10 ml 0,1 mol/l natrijum citratnog pufera pH 2,2. Od ovog rastvora se uzima 1 ml, koji sadrži 1 mg proteina i nanosi na kolonu. Uzorci su analizirani na aminoanalizatoru Biocal model BC-200. Rezultat je izražen u % u odnosu na ukupni sadržaj proteina u uzorku.

12. TEST I OCENA RAZLIKE IZMEDJU DVE SREDINE IZ DVA UZORKA

Rezultatima kojima se želelo utvrditi postojanje razlike dve sredine iz dva uzorka, kao što su analize lipida i nukleinskih kiselina, upotrebljena je statistička obrada rezultata t-testom.

Hipoteza ovog testa polazi od dva nezavisna uzorka od po n-jedinica iz dva nezavisna skupa, čije su sredine jednake, uz pretpostavku da su $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma^2$ i σ_1 i σ_2 varijanse jednog i drugog ispitivanog skupa. U testiranju razlike izmedju dve sredine uzima se za pretpostavku da je

$\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, te se s obzirom na to može izračunati združena varijansa promjenljivih X_1 i X_2 prema poznatom obrascu. Kada je $n_1 = n_2$, standardna greška razlike izračunava se po obrascu:

$$S_{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)} = \sqrt{\frac{2S_{1+2}^2}{n}}$$

Ako je $(n_1 + n_2 - 2) \geq 30$, tada se upotrebljava tablica t-distribucije za $(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$ stepena slobode. Vrednost t je izračunata prema obrascu:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}}$$

Razlike između dve sredine nisu značajne ako je izračunato t manje od onog u tablicama t-distribucije.

IV. R E Z U L T A T I

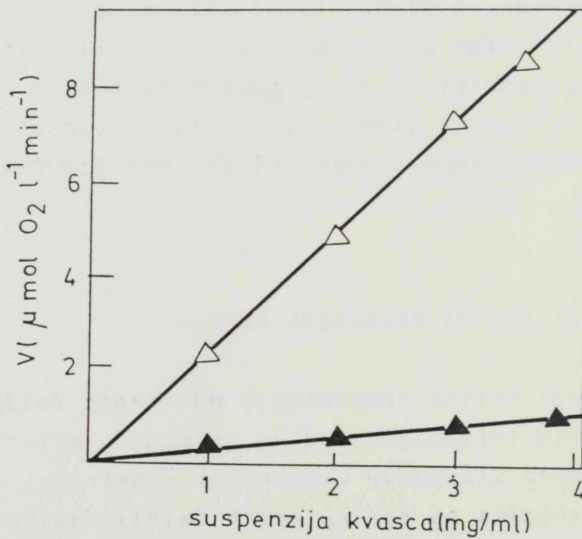
Istraživanje biohemijskih procesa disanja ćelija kvasca u *in vitro* sistemu, vršeno je upotrebom glukoze kao jedinog izvora ugljenikovih atoma. Odredjen je nivo enzima koji imaju značajnu ulogu u procesu aerobne i anaerobne razgradnje glukoze. Zbog ključne uloge citohroma u procesu disanja, utvrđen je njihov kvantitativni sadržaj u divljim i mutiranim sojevima pekarskog kvasca. Ostali ispitivani biohemijski parametri (sadržaj nukleinskih kiselina, sastav proteina i lipida) na nivou celih ćelija, doprinose potpunoj slici biohemijskog stanja ćelija, pri izazvanoj mutaciji benomilom.

1. RESPIRACIJA ĆELIJA PEKARSKOG KVASCA

Endogena brzina respiracije mutiranih ćelija merena je kontinualnim testom, kao što je opisano u materijalu i metodama, pomoću Clarkoove kiseonične elektrode. Brzina usvajanja kiseonika od strane celih ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, upravno je srazmerna koncentraciji ćelija (slika 6).

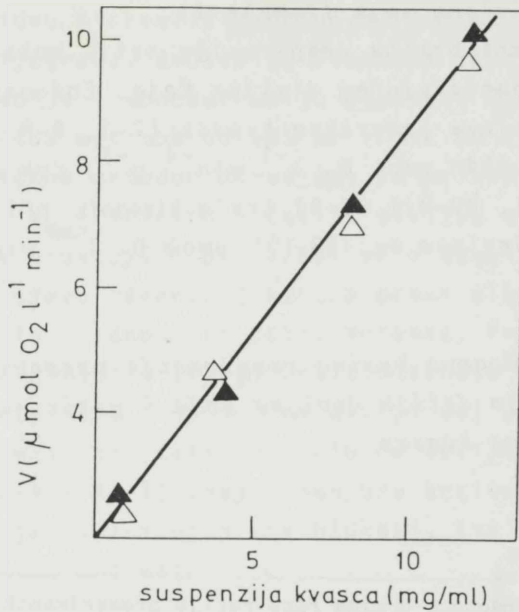
U cilju dobivanja metabolički stabilnih ćelija, vršeno je ispitivanje uticaja preaeriranja na suspenziju ćelija divljeg soja pekarskog kvasca. ćelije divljeg soja pekarskog kvasca nakon 120 minuta aeriranja u medijumu bez C-atoma, na neutralnom pH, stabilizuju metaboličke osobine, što omogućuje kvantitativno merenje njihove respiracije pomoću kiseonične elektrode (slika 6).

Ćelije *petit mutanata* pekarskog kvasca pokazuju istu zavisnost izmedju endogene brzine respiracije i koncentracije ćelija (slika 7). Brzina endogene respiracije *petit mutanata* u odnosu na brzinu respiracije divljeg soja



Slika 6 - Brzina endogene respiracije ćelija pekarskog kvasca

Suspencija ćelija pekarskog kvasca divljeg soja R-1, 20 mg/ml inkubirana u medijumu bez C-atoma u Tris-HCl puferu pH 7,31 100 mmol/l, dodavana je u alikvotima 0,05-0,2 ml u elektrodnu komoru zapremine 1 ml a merena je potrošnja kiseonika. Brzina potrošnje kiseonika sa (▲) i bez prethodne aeracije (△).



Slika 7 - Brzina endogene respiracije ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutanata (RD-1) u zavisnosti od koncentracije ćelija

Suspenzija ćelija pekarskog kvasca (R-1) (Δ) i petit mutanata (RD-1) (\blacktriangle), koncentracije 20 mg/ml, inkubirane u medijumu bez C-atoma u Tris-HCl puferu 100 mmol/l, pH 7,3 na 20°C, prenete su u elektrodnu komoru u alikvotima 0,05-0,6 ml i merena je potrošnja kiseonika.

bez prethodnog aeriranja, nije različita. Ovi rezultati ukazuju da je neophodno vršiti prethodno aeriranje da bi se dobile metabolički stabilne ćelije, koje su pogodne za merenje respiracije pomoću kiseonične elektrode. Nakon aeracije od 120 minuta u medijumu bez C-atoma, endogena brzina respiracije se znatno smanjuje i nastaje jasna razlika u sposobnosti usvajanja kiseonika između petit mutanata i divljeg soja (tabela I).

Endogena brzina respiracije petit mutanata je znatno niža od odgovarajućeg divljeg soja. Endogena respiracija divljih sojeva pekarskog kvasca (R-1, R-M i R-A) kreće se od 920 do 1040 $\text{umol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$, dok njihovi petit mutanti (RD-1, RD-M i RD-A) troše kiseonik pri endogenom metabolizmu brzinom od 153-191 $\text{umol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Tabela I - Endogena brzina respiracije preaeriranih suspenzija ćelija divljeg soja i petit mutanata pekarskog kvasca

| Endogena brzina respiracije preaeriranih suspenzija ćelija pekarskog kvasca | | | | |
|---|---|-----------------------|---|-----------------|
| Ćelije divljih sojeva | | Ćelije petit mutanata | | Odnos v_1/v_2 |
| Soj | Endogena brzina respiracije (v_1) ($\text{umol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) | Soj | Endogena brzina respiracije (v_2) ($\text{umol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) | |
| R-1 | 920,00 | RD-1 | 187,50 | 5,33 |
| R-A | 1029,48 | RD-A | 153,00 | 6,72 |
| R-M | 1040,98 | RD-M | 191,00 | 5,45 |

1.1. Indukcija brzine respiracije ćelija kvasca glukozom

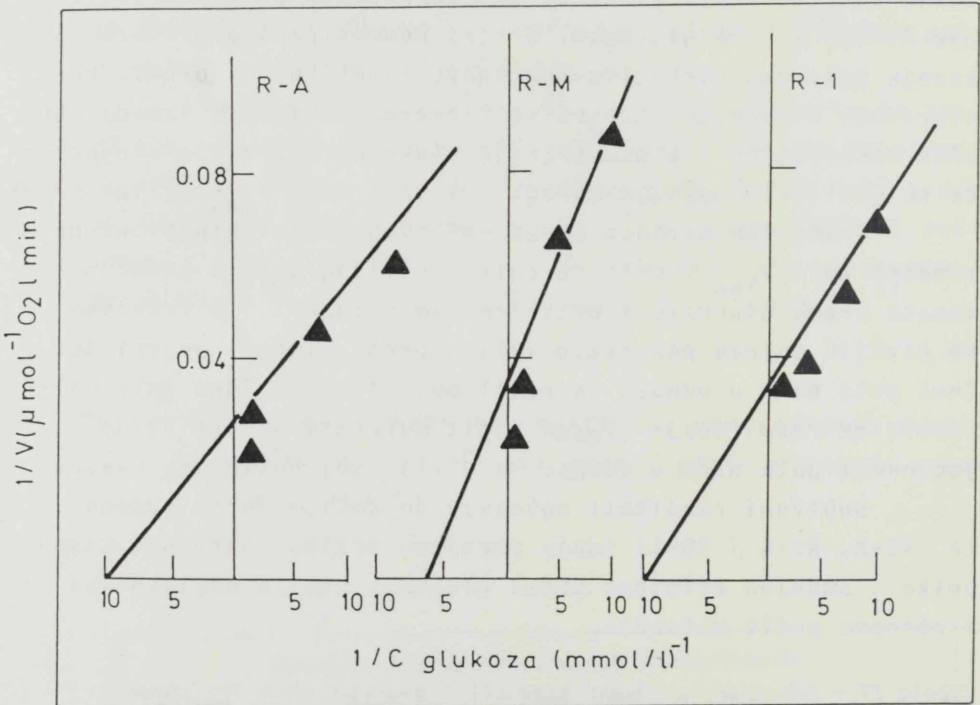
Brzina endogene respiracije ćelija *petit mutanata* i divljeg soja povećava se pod dejstvom glukoze. Povećana koncentracija glukoze daje nelinearnu zavisnost i usporava brzine kod viših koncentracija glukoze, gde se postiže prividno zasićenje ćelija kvasca glukozom. Uticaj koncentracije glukoze pokazuje prividnu Michaelis-Mentenovu kinetiku. Na osnovu recipročnog dijagrama, dobiva se linearna zavisnost između brzine respiracije i koncentracije glukoze, što dalje omogućava da se grafičkom metodom odredi prividna K_m i V_{max} (slike 8 i 9).

Grafičkom metodom određeni su prividni kinetički parametri K_m i V_{max} intaktnih ćelija divljeg soja i *petit mutanata* prema glukozu, i prikazani su u tabeli II. Prividna K_m divljih sojeva pekarskog kvasca prema glukozu je tri do šest puta niža u odnosu na *petit mutante*. Prividne maksimalne brzine respiracije (V_{max}) *petit mutanata* su četiri do jedanaest puta niže u odnosu na divlji soj pekarskog kvasca.

Dobiveni rezultati pokazuju da ćelije *petit mutanata* (RD-M, RD-A i RD-1) imaju smanjenu brzinu potrošnje kiseonika i smanjen afinitet prema glukozu, što je saglasno sa osobinama *petit mutanata*.

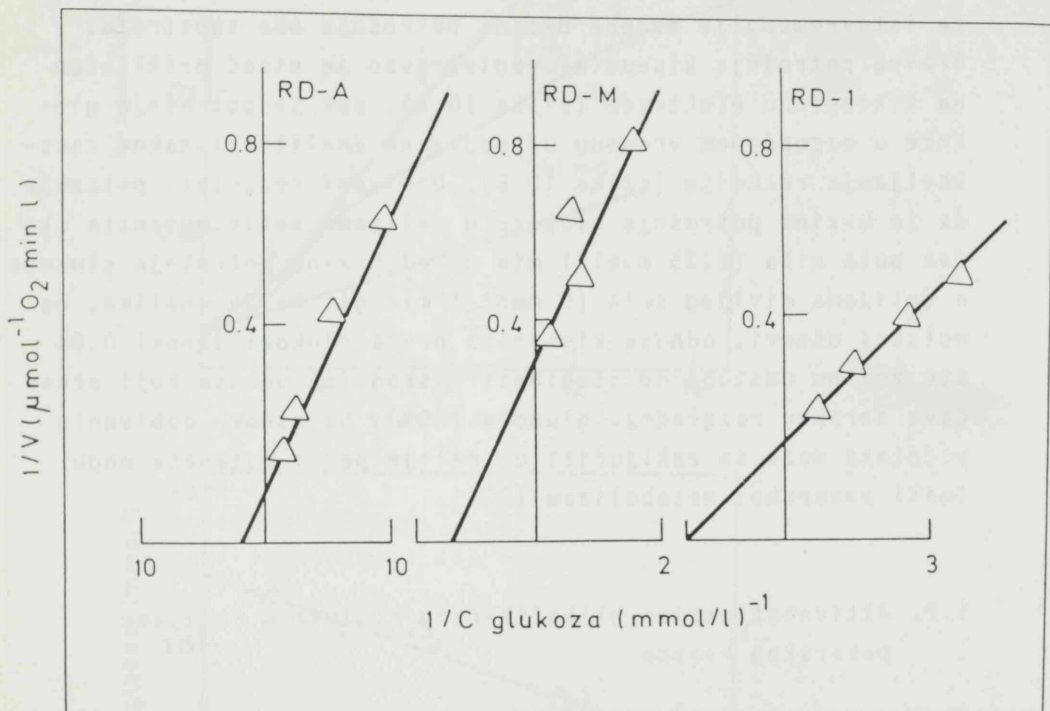
Tabela II - Određjeni prividni kinetički parametri K_m i V_{max} prema glukozu u intaktnim ćelijama pekarskog kvasca

| Soj | K_m (mmol/l) | V_{max} ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$) | $K_{m_{RD}}/K_{m_R}$ | $V_{max_R}/V_{max_{RD}}$ |
|------|-------------------|---|----------------------|--------------------------|
| R-A | 0,10 | 3108,10 | 5,80 | 4,05 |
| RD-A | 0,58 | 766,66 | | |
| R-M | 0,19 | 2804,87 | 3,47 | 11,22 |
| RD-M | 0,66 | 249,99 | | |
| R-1 | 0,10 | 2500,00 | 4,00 | 5,43 |
| RD-1 | 0,40 | 460,00 | | |



Slika 8 - Lineweaver-Burkov dijagram recipročnih vrednosti brzine respiracije intaktnih ćelija divljeg soja pekarskog kvasca i koncentracije glukoze

Suspenzija ćelija pekarskog kvasca sojeva R-1, R-A i R-M preaerirana je 120 minuta na sobnoj temperaturi u medijumu bez C-atoma u 100 mmol/l fosfatnom puferu pH 6,0 u koncentraciji 10 mg/ml. U elektrodnu komoru preneto je 0,5 ml suspenzije kvasca, dopunjeno fosfatnim puferom do 1 ml a respiracija se indukuje sa rastućom koncentracijom glukoze (0,01-10 mmol/l).



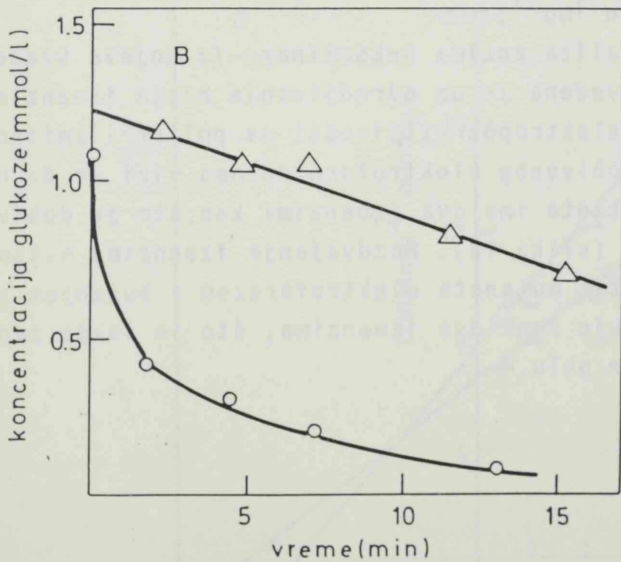
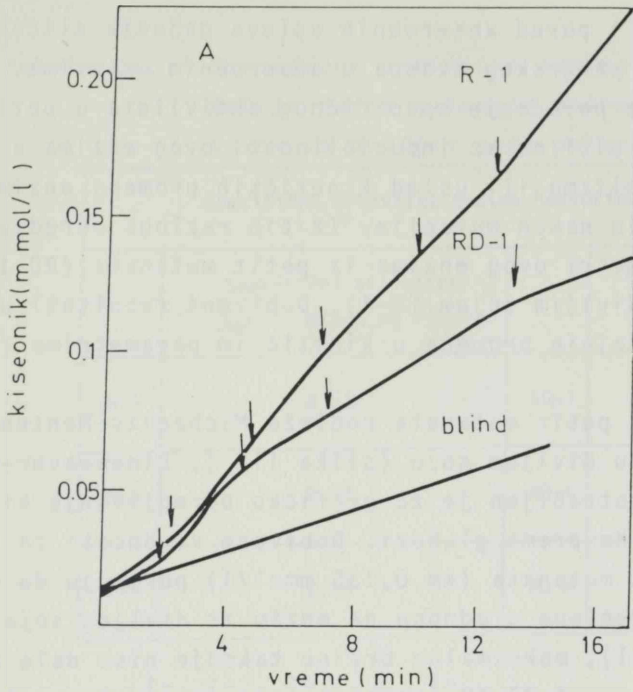
Slika 9 - Lineweaver-Burkov dijagram recipročnih vrednosti brzine respiracije intaktnih ćelija petit mutanata pekarskog kvasca i koncentracije glukoze

Suspenzija petit ćelija pekarskog kvasca RD-1, RD-A, RD-M preaerirana je 120 minuta na sobnoj temperaturi u medijumu bez C-atoma u 100 mmol/l fosfatnom puferu pH 6,0 u koncentraciji od 20 mg/ml. U elektrodnu komoru preneto je 0,5 ml suspenzije kvasca, dopunjeno fosfatnim puferom do 1 ml i respiracija se indukuje sa rastućom koncentracijom glukoze (0,01-10 mmol/l).

Da bi se utvrdio način razgradnje glukoze u ćelijama petit mutanata koji su pokazali manji afinitet prema glukozi i smanjenu efikasnost razgradnje glukoze (veća vrednost za K_m i manja za V_{max} u odnosu na divlji soj), ispitana je brzina potrošnje glukoze u uslovima prividnog zasićenja ćelija glukozom. U simultanoj reakciji potrošnje kiseonika i glukoze istovremeno je merena brzina potrošnje oba supstrata. Brzinu potrošnje kiseonika registrovao je pisač priključen na kiseoničnu elektrodu (slika 10 A), dok je potrošnja glukoze u naznačenom vremenu određivana analitički, nakon zaustavljanja reakcije (slika 10 B). Dobiveni rezultati pokazuju da je brzina potrošnje glukoze u ćelijama petit mutanata oko dva puta niža (2,35 mmol/l min g) od brzine potrošnje glukoze u ćelijama divljeg soja (5 mmol/l min g). Dalja analiza, na molskoj osnovi, odnosa kiseonika prema glukozi iznosi 0,04 što znatno odstupa od stehiometrijskog (6) odnosa koji označava aerobnu razgradnju glukoze (209). Na osnovu dobivenih podataka može se zaključiti da ćelije petit mutanata mogu imati anaerobni metabolizam (209).

1.2. Aktivnost enzima glikolitičkog ciklusa u ćelijama pekarskog kvasca

Prvi enzim glikolitičkog ciklusa je heksokinaza EC (2.7.1.1.). Aktivnost ovog enzima značajno zavisi od uslova gajenja kvasca a poznato je da zavisi i od stepena aeracije. U tabeli III upoređen je specifični aktivitet heksokinaze petit mutanata pekarskog kvasca sa divljim sojem pekarskog kvasca kao referentnom vrednošću. Specifični aktivitet heksokinaze je dva do tri puta veći u ćelijama petit mutanata u odnosu na ćelije divljeg soja pekarskog kvasca. Povećan specifični aktivitet ovog enzima nadjen je u ćelijama pekarskog kvasca gajenim u anaerobnim uslovima. Ovi rezultati takodje ukazuju da je metabolizam u ćelijama



Slika 10 - Brzina potrošnje kiseonika i glukoze u simultanoj reakciji: A) brzina potrošnje kiseonika, B) brzina potrošnje glukoze u naznačenom vremenu potrošnje kiseonika. Eksperiment je izveden sa RD-1 (Δ) i kontrolnim uzorkom R-1 (o)

petit mutanata i pored anaerobnih uslova gajenja sličan metabolizmu ćelija pekarskog kvasca u anaerobnim uslovima.

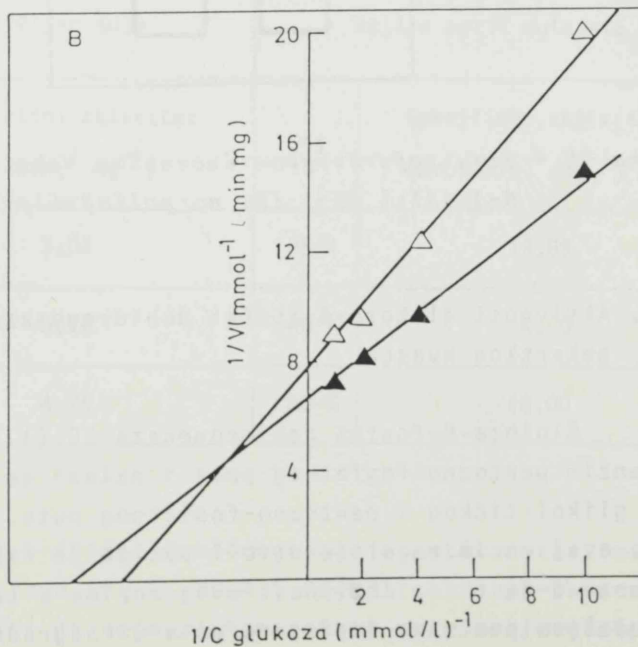
Značajno povećanje specifičnog aktiviteta u petit mutantima može biti odraz inducibilnosti ovog enzima u anaerobnom metabolizmu ili usled kinetičkih promena enzima koje su usledile nakon mutacije. Iz tih razloga određeni su kinetički parametri ovog enzima iz petit mutanata (RD-1) i upoređeni sa divljim sojem (R-1). Dobiveni rezultati ukazuju da nema značajnih promena u kinetičkim parametrima (slika 11).

Enzim iz petit mutanata podleže Michaelis-Mentenovoj kinetici kao i u divljem soju (slika 11). Lineweaver-Burkov dijagram upotrebljen je za grafičko određivanje kinetičkih parametara K_m prema glukozu. Dobivene vrednosti za K_m enzima iz petit mutanata ($K_m 0,135 \text{ mmol/l}$) pokazuju da one nisu znatno izmenjene u odnosu na enzim iz divljeg soja ($K_m 0,107 \text{ mmol/l}$), maksimalne brzine takodje nisu dale značajne razlike ($V_{\max_{RD}} 1,37 \cdot 10^{-1} \text{ mmol/l}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; $V_{\max_R} 1,47 \cdot 10^{-1} \text{ mmol/l}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

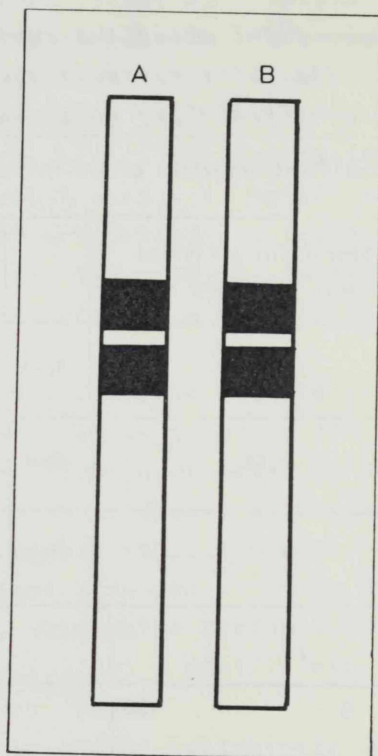
Dalja analiza enzima heksokinaze iz sojeva kvasca (R-1 i RD-1) izvedena je uz određivanje broja izoenzima na osnovu njihove elektropokretljivosti na poliakrilamidnom gelu. Na osnovu dobivenog elektroforetograma vidi se da heksokinaza petit mutanta ima dva izoenzima kao što je dobiveno i za divlji soj (slika 12). Razdvajanje izoenzima heksokinaze iz ćelija petit mutanata elektroforezom i bojenjem na aktivnost pokazuje zone dva izoenzima, što je inače zapaženo i na skrobnom gelu.

Tabela III - Specifični aktivitet enzima heksokinaze ćelija *petit mutanata* upoređen sa enzimom iz divljeg soja pekarskog kvasca

| Specifični aktivitet enzima heksokinaze EC (2.7.1.1.) | | | |
|---|---|------|---|
| | Specifični aktivitet ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | | Specifični aktivitet ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
| R-1 | 8,81 | RD-1 | 21,26 |
| R-A | 2,67 | RD-A | 4,33 |
| R-M | 7,15 | RD-M | 20,35 |



Slika 11 - Reakciona kinetika enzima heksokinaze u divljem soju pekarskog kvasca, R-1 (▲) i njegovog RD-mutanta, RD-1 (△)



Slika 12 - Elektroforetogram izoenzima heksinaze iz sojeva R-1 (A) i RD-1 (B) na poliakrilamidnom gelu

1.3. Aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze u ćelijama pekarskog kvasca

Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza EC (1.1.1.49) ključni je enzim pentozno-fosfatnog puta i nalazi se na mestu grananja glikolitičkog i pentozno-fosfatnog puta. Zbog svog položaja ovaj enzim reguliše nivo i put dalje razgradnje nastale glukoze-6-fosfata. Aktivnost ovog enzima u tesnoj je vezi sa učešćem pentozno-fosfatnog puta u razgradnji glukoze. U ćelijama pekarskog kvasca oko 80% glukoze se razgradjuje glikolitičkim putem, a svega 20% pentozno-fosfatnim putem.

Iz tog razloga aktivnost enzima koji su uključeni u pentozno-fosfatnom putu smanjena je u odnosu na aktivnost enzima gde je taj put razgradnje glukoze značajnije upotrebljen.

Ćelije petit mutanata imaju dva do šest puta veću aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze u odnosu na divlji soj (tabela IV).

Tabela IV - Specifična aktivnost enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze u ćelijama divljeg soja i petit mutanata pekarskog kvasca

| Specifični aktivitet glukoze-6-fosfat dehidrogenaze | | | |
|---|---|-----------------------|---|
| Ćelije divljeg soja | | Ćelije petit mutanata | |
| Soj | Specifični aktivitet ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | Soj | Specifični aktivitet ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
| R-1 | 3,05 | RD-1 | 19,89 |
| R-A | 0,79 | RD-A | 4,20 |
| R-M | 4,85 | RD-M | 10,00 |

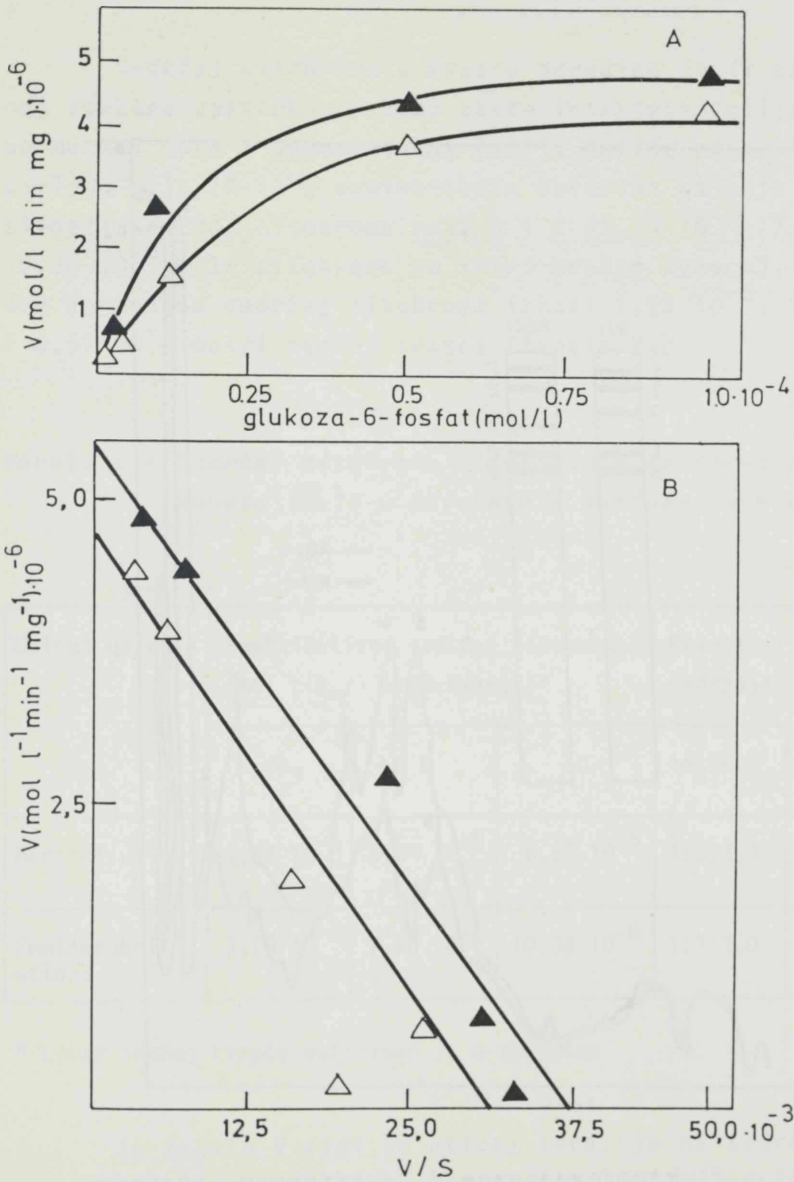
Glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u petit mutantima svih ispitivanih sojeva (RD-1, RD-A i RD-M) znatno je povećana, što može ukazati na veću zastupljenost razgradnje glukoze pentozno-fosfatnim putem.

Dalja analiza enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze

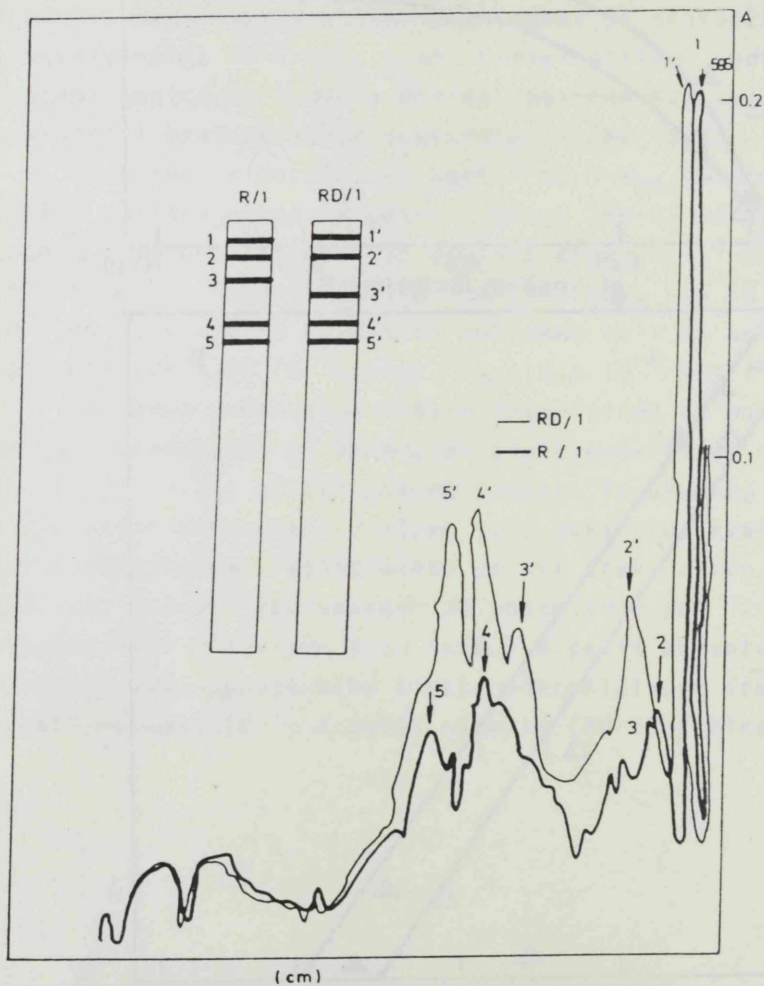
petit mutanata (RD-1), vršena je ispitivanjem kinetike u poredjenju sa enzimom iz divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca. Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza iz petit mutanata (RD-1) podleže Michaelis-Mentenovoj kinetici, kao što je dobiveno i za enzim iz divljeg soja (R-1) (slika 13 A). Na osnovu dobivene Michaelis-Mentenove kinetike primenjena je grafička metoda za odredjivanje K_m i V_{max} prema Eadie-Hofsteeru, gde je data linearna zavisnost izmedju brzine enzimske reakcije i količnika brzine i koncentracije supstrata (slika 13 B).

Dobiveni kinetički parametri K_m i V_{max} enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze iz petit mutanta (RD-1) nisu bitno izmenjeni u odnosu na enzim iz divljeg soja (R-1). K_m enzima iz petit mutanata iznosi $1,55 \cdot 10^{-4}$ mol/l, V_{max} $4,5 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹, a slične vrednosti dobivene su i za enzim iz divljeg soja (K_m $1,52 \cdot 10^{-4}$ mol/l, V_{max} $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹).

Metodom vertikalne blok-elektroforeze na poliakrilamidnom gelu razdvojeni su izoenzimi glukoze-6-fosfat dehidrogenaze prema svojoj elektropokretljivosti iz ukupnog homogenata ćelija petit mutanata i divljeg soja pekarskog kvasca. Na elektroforetogramu registrovano je pet traka nakon bojenja na aktivnost enzima, što ukazuje na postojanje pet izoenzima u ćelijama kako u divljem soju tako i u petit mutantu. četiri izoenzima imaju podjednaku elektropokretljivost izmedju enzima divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) (slika 14).



Slika 13 - Reakciona kinetika glukoze-6-fosfat dehidrogenaze iz petit mutanata (Δ) i divljeg soja pekarskog kvasca (\blacktriangle): A) Michaelis-Mentenov graf, B) Eadie-Hofsteeov dijagram



Slika 14 - Elektroforetogram i denzitogram izoenzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze ćelija petit mutanata (RD-1) i divljeg soja (R-1): A) shematski prikaz elektroforetograma, B) denzitogram elektroforetograma R-1 (-), RD-1 (-)

2. SADRŽAJ CITOHROMA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA

Sadržaj citohroma u kvascu odredjen je iz apsorpcionog spektra upotrebom vlažne paste intaktnih ćelija kvasca po metodi Oure i Suomalainena (137). Ćelije pekarskog kvasca divljeg soja (R-1) u semiaerobnim uslovima gajenja imaju sledeći sadržaj citohroma aa_3 , b i c ($3,73 \cdot 10^{-6}$, $7,9 \cdot 10^{-6}$ i $10,38 \cdot 10^{-6}$ mola citohroma po litri svežeg kvasca), dok snažnom aeracijom sadržaj citohroma iznosi $1,93 \cdot 10^{-5}$, $5,44 \cdot 10^{-5}$ i $6,52 \cdot 10^{-5}$ mol/l svežeg kvasca (tabela V).

Tabela V - Sadržaj citohroma u intaktnim ćelijama pekarskog kvasca (R-1) u aerobnim i semiaerobnim uslovima

| Uslovi gajenja | Kvantitativni sadržaj citohroma (mol cit./l svež.kvasca)* | | | Relativni odnos sadržaja citohroma | |
|--------------------|--|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|--------|
| | aa_3 | b | c | $aa_3:b:c$ | $b:c$ |
| Aerobni uslovi | $1,93 \cdot 10^{-5}$ | $5,44 \cdot 10^{-5}$ | $6,52 \cdot 10^{-5}$ | 1:3:3,4 | 1:1,13 |
| Semiaerobni uslovi | $3,73 \cdot 10^{-6}$ | $7,90 \cdot 10^{-6}$ | $10,38 \cdot 10^{-6}$ | 1:3:3,0 | 1:1,31 |

* Litar svežeg kvasca definisan je u metodama

Iz tabele V vidi se uticaj aeracije na sadržaj citohroma u divljem soju pekarskog kvasca (R-1). Sadržaj citohroma pod uslovima snažne aeracije pet do šest puta je veći od sadržaja citohroma u semiaerobnim uslovima gajenja.

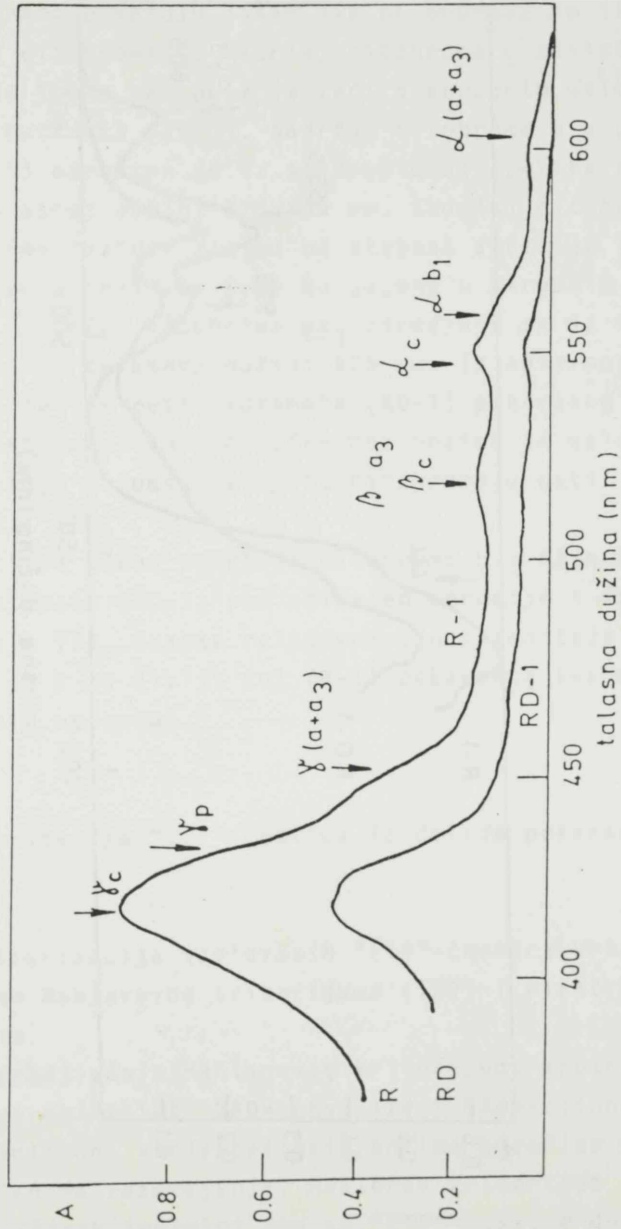
Relativni odnos sadržaja citohroma \underline{aa}_3 : \underline{b} : \underline{c} = 1:3:3,4 u aerobnim uslovima pokazuje da je citohrom \underline{aa}_3 u približno jednakom odnosu sa sadržajem citohroma \underline{b} i \underline{c} , odnosno da su citohromi \underline{b} i \underline{c} oko tri puta veći od sadržaja citohroma \underline{aa}_3 u intaktnim ćelijama kvasca soja (R-1) gajenim u aerobnim uslovima. Relativni odnos sadržaja citohroma u semiaerobnim uslovima gajenja divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca je sledeći: \underline{aa}_3 : \underline{b} : \underline{c} = 1:2:3. Ovaj odnos pokazuje da je sadržaj citohroma \underline{b} dva puta a sadržaj citohroma \underline{c} čak tri puta veći od sadržaja citohroma \underline{aa}_3 .

Relativni odnos sadržaja citohroma \underline{b} prema sadržaju citohroma \underline{c} je 1:1, a neznatno je izmenjen pod uticajem aeracije.

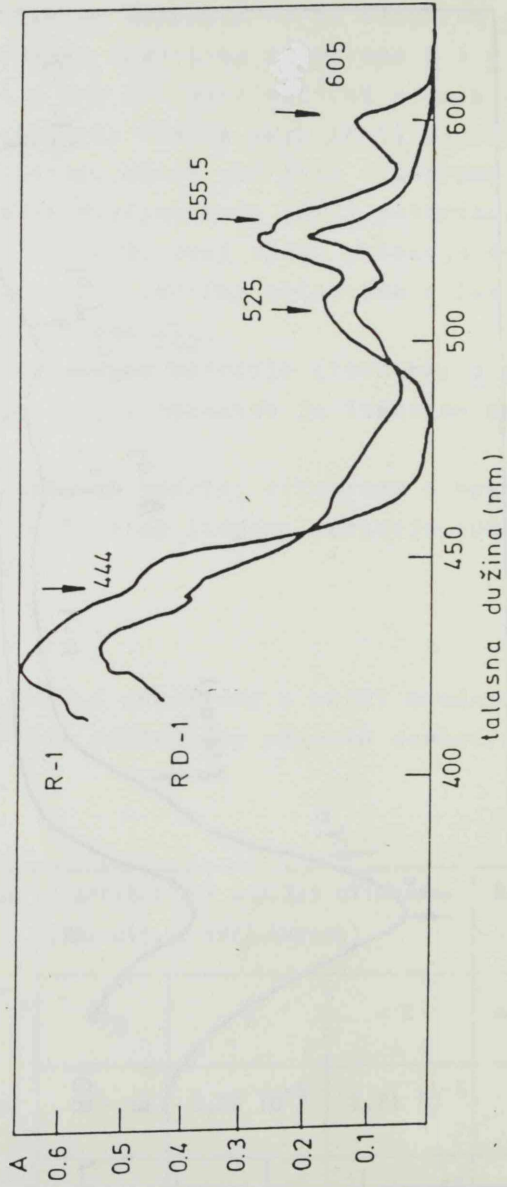
Kvantitativni sadržaj citohroma u petit mutantu (RD-1) pod uslovima različitog stepena aeracije tokom gajenja dat je u tabeli VI.

Tabela VI - Sadržaj citohroma u petit mutantima pod uticajem različitog stepena aeracije (RD-1)

| Uslovi gajenja | Kvantitativni sadržaj citohroma (mol cit./l svež.kvasca) | | | Relativni odnos sadržaja citohroma | |
|--------------------|---|----------------------|----------------------|--|-----------------------------------|
| | \underline{aa}_3 | \underline{b} | \underline{c} | \underline{aa}_3 : \underline{b} : \underline{c} | \underline{b} : \underline{c} |
| Aerobni uslovi | - | $3,69 \cdot 10^{-5}$ | $4,71 \cdot 10^{-5}$ | - | 1:1,3 |
| Semiaerobni uslovi | - | $7,53 \cdot 10^{-6}$ | $9,76 \cdot 10^{-6}$ | - | 1:1,25 |



Slika 15 - ApSORpcioni spekTar intakTnih ćelija kvasca gajenih u semiaerobnim uslovima



Slika 16 - ApSORPCIONI SPEKTAR INTAKTNIH ćELIJA PEKARSKOG
KVASCA GAJENIH U AEROBNIM USLOVIMA

Apsorpcioni spektri nativnih ćelija pekarskog kvasca i petit mutanata pokazuju jasan pik na 560-532 nm što odgovara spektru citohroma c. Sadržaj citohroma c zavisi od stepena aeracije i oko pet puta je veći u aerobnim uslovima gajenja petit mutanata (RD-1). Sadržaj citohroma b u petit mutantima (RD-1) odredjen je iz apsorpcionog spektra nativnih ćelija na talasnoj dužini 520-550 nm. Sadržaj citohroma b u petit mutantima takodje zavisi od stepena aeracije i pet puta se povećava u ćelijama koje su gajene u aerobnim uslovima (tabela VI). Sadržaj citohroma aa₃ odredjuje se iz trake spektra citohroma na talasnoj dužini 605 nm. Iz apsorpcionog spektra nativnih ćelija petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca može se videti odsustvo ovog pika bez obzira na uslove gajenja, što ukazuje na odsustvo ovog citohroma u petit mutantima (slike 15 i 16).

Relativni odnos sadržaja citohroma b:c nije izmenjen kod petit mutanata (RD-1) pod uticajem aeracije i iznosi 1:1,30 (tabela VI). Ovakav relativni odnos sadržaja citohroma b:c dobiven je i za divlji soj (R-1) pekarskog kvasca gajenog u semiaerobnim uslovima.

2.1. Karakterizacija "ETP"-čestica iz ćelija pekarskog kvasca

Karakterizacija izolovanih "ETP"-čestica vršena je odredjivanjem Mahlerovog kriterijuma (139) i elektronskom mikroskopijom.

Za odredjivanje Mahlerovog kriterijuma upotrebljeni su specifični aktiviteti NADH-oksidade i NADH-citohrom-c-reduktaze. Specifični aktivitet ovih enzima odredjen je u različitim stepenima razdvajanja. Mahlerov kriterijum treba da je veći ili jednak jedinici ako su "ETP"-čestice dobro izolovane.

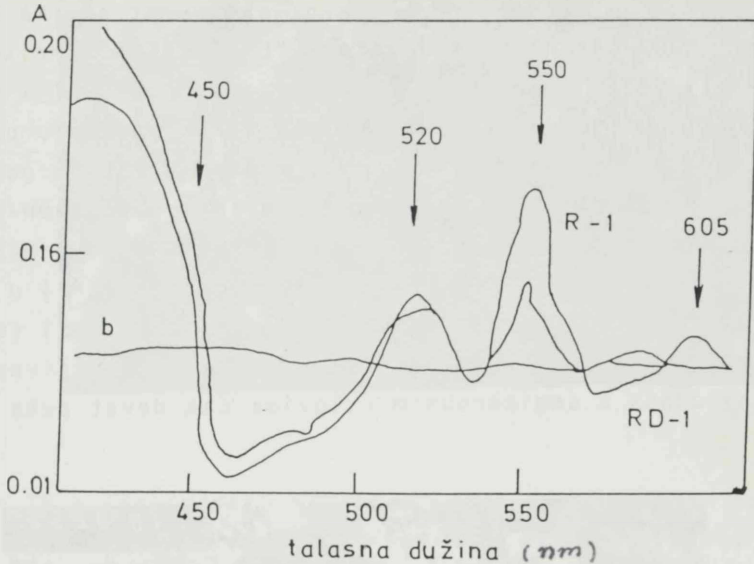
Tabela VII pokazuje vrednosti za izolovane frakcije koje po metodi koja je opisana na strani 29 sadrži "ETP"-čestice. Mahlerov kriterijum ima zadovoljavajuće vrednosti za izolovane "ETP"-čestice iz divljeg soja (R-1) i petit mutanata (RD-1) ćelija pekarskog kvasca gajenih u aerobnim i semiaerobnim uslovima.

Tabela VII - Vrednost Mahlerovog kriterijuma za izolovane "ETP"-čestice

| Preparati | Mahlerov kriterijum (sp.akt.fra u R_1 / sp.akt.fra u S_1) | |
|-----------------------|---|---------------------------|
| | NADH-oksidaza | NADH-citohrom-c-reduktaza |
| R-1 (Semiaerobni) | 10,61 | 5,20 |
| RD-1 (Semiaerobni) | 1,05 | 4,30 |
| R-1 (Aerobni) | 1,02 | 3,25 |
| RD-1 (Aerobni) | 3,29 | 5,92 |

Pored Mahlerovog kriterijuma, izolovanim ETP-česticama snimljen je i diferencijalni spektar.

Diferencijalni spektar "ETP"-čestica dobivenih iz ćelija petit mutanata (RD-1) i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca redukovanih ditionitom prema oksidovanim, izveden je na sobnoj temperaturi i prikazan na slici 17.



Slika 17 - Diferencijalni spektar "ETP"-čestica iz ćelija petit mutanata (RD-1) i divljeg soja (R-1) redukovanih prema oksidovanim

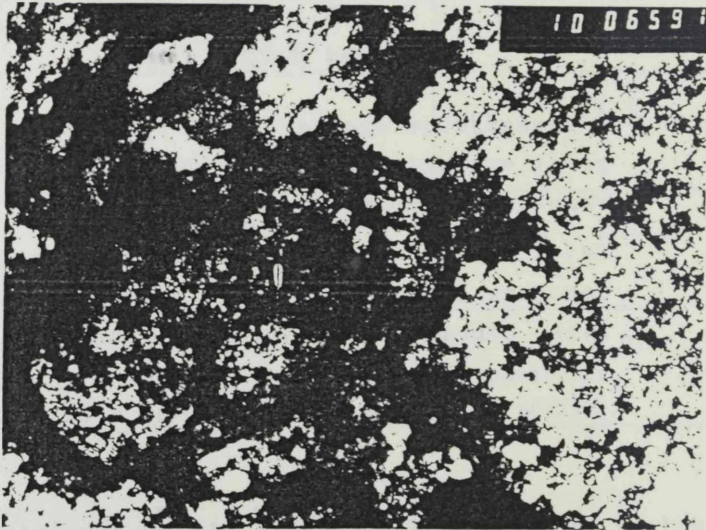
Kriva b predstavlja baznu liniju spektra izvedenog na sobnoj temperaturi, pre dodatka ditionita. Uzorak i kontrola sadrže oko 5 mg proteina resuspendovanog u 1 ml 20 mmol/l, fosfatnog pufera pH 7,5. Redukcija je izvršena dodatkom 3 mg ditionita u uzorak

Apsorpcioni maksimum 605 nm, 553 i 445 nm pokazuju prisustvo citohroma a, b i aa₃ u preparatu divljeg soja, dok "ETP"-čestice petit mutanata nemaju maksimum na 605 nm, što takodje potvrđuje nedostatak citohrom oksidaze u ispitivanim mutantima.

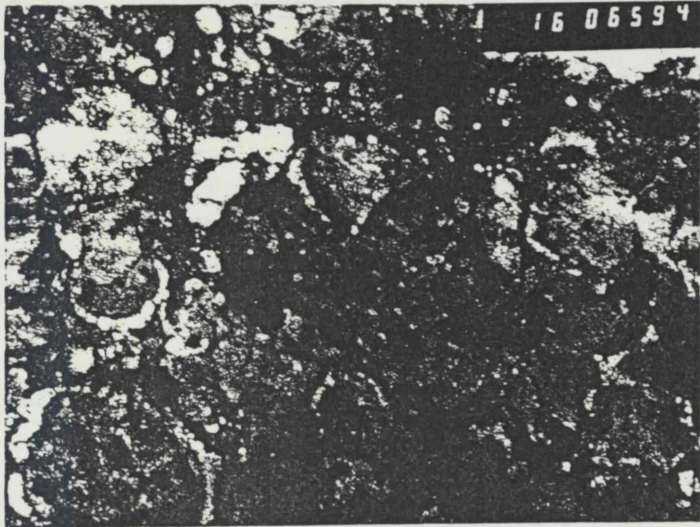
Druga provera dobivenih preparata "ETP"-čestica izvršena je elektronskim mikroskopom. Elektronski mikrografi pokazuju membranske tvorevine dobivene iz petit mutanata (RD-1) koje se ne razlikuju kada se uporede sa divljim sojem pekarskog kvasca (slike 18 i 19).

Uticaj stepena aeracije na aktivnost enzima NADH-oksidade i NADH-citohrom-c-reduktaze "ETP"-čestica prikazan je u tabeli VIII. U aerobnim uslovima gajenja, divlji soj (R-1) ima osam puta veću aktivnost ispitivanih enzima u odnosu na semiaerobne uslove gajenja. Petit mutanti (RD-1) gajeni u aerobnim uslovima pokazuju povećanu aktivnost NADH-oksidade, čak dvanaest puta u odnosu na semiaerobne uslove gajenja.

Aktivnost NADH-oksidade divljeg soja (R-1) u poredjenju sa aktivnošću NADH-oksidade petit mutanata (RD-1) gajenih u aerobnim uslovima, pokazuje četiri puta veću aktivnost, dok je taj odnos u semiaerobnim uslovima čak devet puta veći.



Slika 18 - Elektronski mikrograf frakcije označene kao "ETP"-čestice dobivenih iz divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca



Slika 19 - Elektronski mikrograf frakcije označene kao "ETP"-čestice dobivenih iz petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca

Aktivnost NADH-citohrom-c-reduktaze u petit mutantima (RD-1) oko sedam puta je niža u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca.

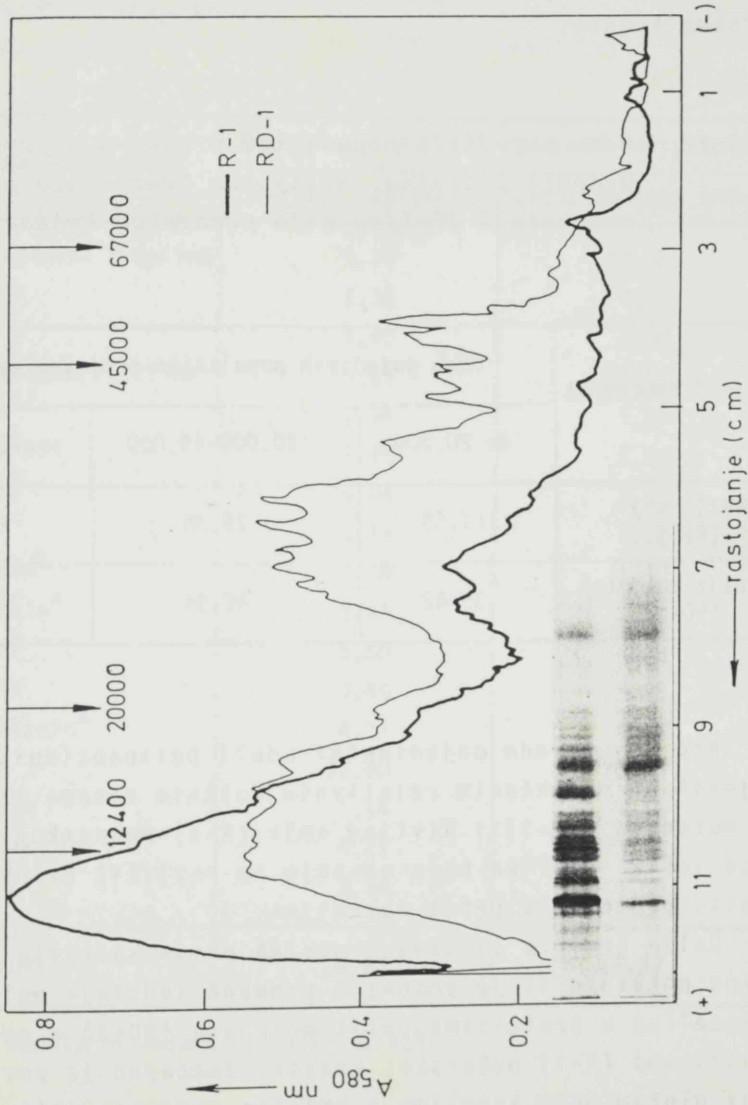
Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da stepen aeracije ima značajan uticaj na kvantitativni sadržaj citohroma, NADH-oksidge i NADH-citohrom-c-reduktaze u ćelijama divljeg soja i petit mutanata pekarskog kvasca. Sadržaj citohroma NADH-oksidge i NADH-citohrom-c-reduktaze u petit mutantima značajno je niži u odnosu na sadržaj u divljem soju i u aerobnim uslovima.

Tabela VIII - Uticaj stepena aeracije na enzim NADH-oksidazu i NADH-citohrom-c-reduktaze "ETP"-čestica frakcije dobivene iz divljeg soja (R-1) i petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca

| Soj | Aerobni uslovi gajenja | | Semiaerobni uslovi gajenja | |
|------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | NADH-oksidaza (IJ/mg) | NADH-citohrom -c-redu. (IJ/mg) | NADH-oksidaza (IJ/mg) | NADH-citohrom -c-redu. (IJ/mg) |
| R-1 | 0,143 | 0,0907 | 0,0175 | - |
| RD-1 | 0,039 | 0,0138 | 0,002 | - |

3. KARAKTERIZACIJA PROTEINA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA

Analiza proteina petit ćelija pekarskog kvasca iz ukupnog homogenata, mikrozomske i solubilne frakcije izvršena je jednodimenzionalnom gel-elektroforezom. Na slici 20 prikazan je denzitogram elektroforetograma proteina ćelijskog homogenata petit mutanata (RD-1) i homogenata divljeg soja (R-1) ćelija pekarskog kvasca. Na osnovu denzitograma izračunati su udeli proteina sa sledećim relativnim molskim masama: do 20.000, od 20.000 do 45.000 i relativne molske mase preko 45.000. Relativne molske mase određene su preko čistih standardnih supstanci sa poznatim relativnim molskim masama kao što je citohrom c (Mr 12.400), himotripsinogen (Mr 20.000), albumin iz jajeta (Mr 45.000) i govedji serum albumin (Mr 67.000).



Slika 20 - Densitogram elektroforetograma proteina
ćelijskog homogenata petit mutanata (RD-1)
i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca

Tabela IX pokazuje udeo pojedinih polipeptidnih lanaca proteina u populaciji ukupnih proteina, ćelijskog homogenata petit mutanata (RD-1) kao i za divlji soj (R-1) pekarskog kvasca.

Tabela IX - Udeo pojedinih populacija proteina u populaciji ukupnih proteina, ćelijskog homogenata petit mutanata i divljeg soja pekarskog kvasca

| Ćelijski homogenat | Udeo pojedinih populacija proteina sa Mr | | |
|---------------------|--|---------------|--------------|
| | do 20.000 | 20.000-45.000 | preko 45.000 |
| Divlji soj (R-1) | 61,55 | 25,38 | 13,08 |
| Petit mutant (RD-1) | 35,42 | 40,34 | 24,48 |

Ako se uporede pojedinačni udeli polipeptidnih lanaca odredjenih po naznačenim relativnim molskim masama izmedju petit mutanata (RD-1) i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, vidi se velika razlika koja ukazuje na različit kvantitativni sastav proteina u petit mutantima.

Dalja analiza sastava proteina prema sadržaju amino-kiselina pokazuje da je značajna promena sadržaja polarnih aminokiselina u proteinima petit mutanata (RD-1) u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca. Značajno je povišen sadržaj glutaminske kiseline a smanjen sadržaj prolina i leucina (Tabela X).

Tabela X - Aminokiselinski sastav proteina celih ćelija petit mutanata (RD-1) i divljeg soja pekar-skog kvasca

| Aminokiseline | Aminokiseline u (%) računati na protein | |
|--------------------------|---|----------------------|
| | divlji soj (R-1) | petit mutanti (RD-1) |
| Asparaginska kiselina | 9,78 | 10,56 |
| Treonin | 3,30 | 4,70 |
| Serin | 3,40 | 4,00 |
| Glutaminska kiselina | 19,69 | 21,17 |
| Prolin ^{a*} | 2,54 | 1,65 |
| Glicin ^a | 5,95 | 5,83 |
| Alanin ^a | 6,04 | 5,63 |
| Valin ^a | 8,79 | 7,62 |
| Metionin ^a | 1,18 | 1,10 |
| Izoleucin ^a | 2,71 | 2,60 |
| Leucin ^a | 5,80 | 4,98 |
| Tirozin | 3,46 | 3,58 |
| Fenilalanin ^a | 4,71 | 4,47 |
| Lizin | 12,90 | 12,39 |
| Histidin | 1,14 | 1,12 |
| Amonijak | 4,21 | 3,90 |
| Arginin | 4,36 | 4,86 |
| Polarnost | 50,07 | 52,12 |

* a - nepolarni aminokiselinski ostaci

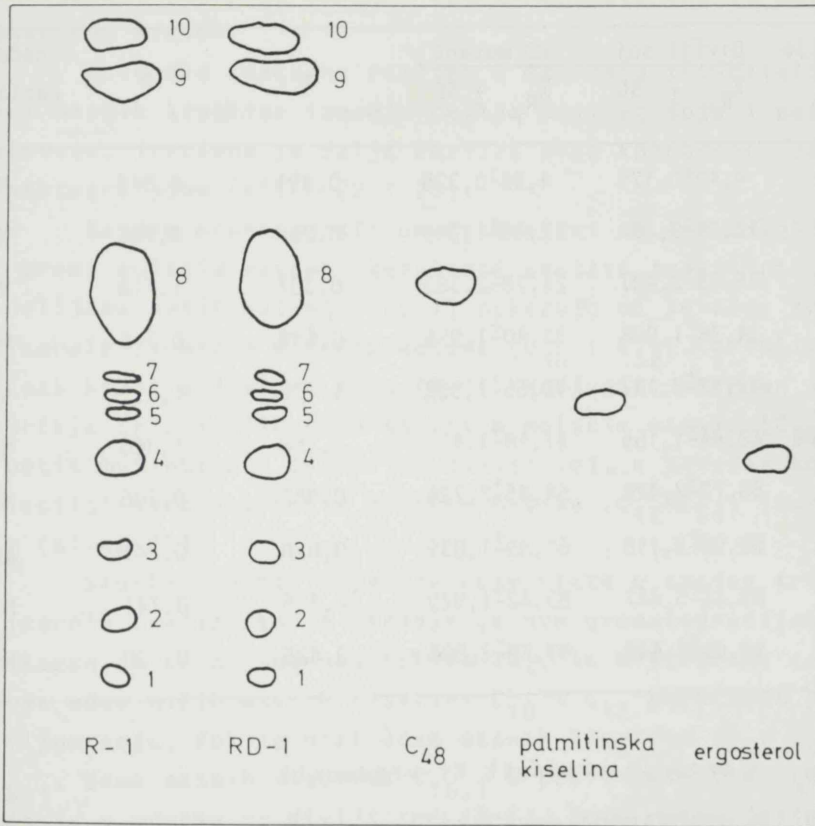
Pored razlike u sadržaju aminokiselina, prolina i glutaminske kiseline, uočava se i razlika u sadržaju nepolarnih aminokiselina što može imati uticaja i na ukupan sadržaj rastvorljivih proteina u petit mutantima.

4. LIPIDNI SASTAV ĆELIJA PEKARSKOG KVASCA

Primenom prethodno opisanih metoda ekstrakcije lipida, dobiveni ekstrakti (strana 30) analizirani su jednodimenzionalno i dvodimenzionalno hromatografijom na tankom sloju. Slike 21-26 i tabele XI-XIV pokazuju rezultate o kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju neutralnih lipida i fosfolipida u ćelijama petit mutanata (RD-1). Kao kontrolni uzorak upotrebljen je sadržaj lipida u ćelijama divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.

Jednodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju razdvojeno je deset mrlja u sistemu razvijaača petroletar, etiletar, sirćetna kiselina (70:30:2) iz petit mutanata (RD-1) kao i iz kontrolnog uzorka (R-1) (slika 21). Na osnovu dobivenih hromatograma određene su Rf vrednosti za dobivene mrlje. Primenom "t-testa" utvrđeno je da kvalitativnih promena nema u sastavu neutralnih lipida petit mutanata u odnosu na kontrolni uzorak. Testiranje Rf vrednosti frakcija neutralnih lipida kontrolnog uzorka i petit mutanata pokazuje da nema značajnih razlika (tabela XI).

Dokazivanje dobivenih razdvojenih lipidnih frakcija određeno je prema čistim standardnim supstancama (slobodne masne kiseline - stearinska i palmitinska -, ergosterol, holesterol, triacilgliceroli - (tristearat, tripalmitat i trioleat) (slika 21). Dokazani su triacilgliceroli (mrlja 8), zatim slede ergosterol (mrlja 4), slobodne masne kiseline (tačka 6 i 7), dok mrlje 1, 2 i 3 odgovaraju prema literaturnim navodima Petrović i Bećarevića (212) monoacilglicerolima, 1,2-diacilglicerolu i 1,3-diacilglicerolu.



Slika 21 - Hromatogram dobiven jednodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju neutralnih lipida petit mutanata (RD-1) i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.

Hromatografija je izvedena na silika gelu GF₂₅₄ u sistemu razvijaača petroletar, dietiletar, sirćetna kiselina u zapreminskom odnosu 70:30:2. Naneto je po 100 ul ekstrakta dobivenog iz petit mutanta (RD-1) i ekstrakta divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.

Tabela XI - Testiranje razlike između Rf vrednosti frakcija lipida iz ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutantata (RD-1) pekarskog kvasca primenom t-testa

| Mrlje br. | Divlji soj | | RD mutant | | t | p | Značajnost razlike |
|--------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-------|-------|-----------------------|
| | \bar{X}_{R_f} | \pm SD | \bar{X}_{R_f} | \pm SD | | | |
| 1 | 4,40 | $\pm 0,179$ | 4,58 | $\pm 0,335$ | 0,491 | 0,816 | NS |
| 2 | 12,70 | $\pm 9,29$ | 12,44 | $\pm 1,249$ | 0,338 | 0,706 | NS |
| 3 | 25,38 | $\pm 2,407$ | 24,78 | $\pm 2,383$ | 0,307 | 1,718 | NS |
| 4 | 34,28 | $\pm 1,898$ | 33,40 | $\pm 1,956$ | 0,648 | 0,706 | NS |
| 5 | 42,32 | $\pm 2,137$ | 40,65 | $\pm 1,532$ | 1,270 | 1,397 | NS |
| 6 | 48,84 | $\pm 1,155$ | 47,18 | $\pm 1,482$ | 1,768 | 1,360 | NS |
| 7 | 55,72 | $\pm 2,426$ | 54,85 | $\pm 2,726$ | 0,482 | 0,706 | NS |
| 8 | 60,92 | $\pm 2,118$ | 60,89 | $\pm 1,839$ | 0,020 | 0,741 | NS |
| 9 | 85,33 | $\pm 5,447$ | 83,42 | $\pm 1,829$ | 0,476 | 0,741 | NS |
| 10 | 94,63 | $\pm 3,448$ | 93,78 | $\pm 2,883$ | 0,425 | 0,700 | NS |

\bar{X}_{R_f} = srednja vrednost Rf-vrednosti

SD = standardna devijacija

NS = nije značajna razlika

S = značajna razlika

t = izračunata vrednost

p = stepen verovatnoće

Kvantitativni sadržaj razdvojenih lipidnih frakcija prikazan je u tabeli XII. Primenom t-testa nadjena je značajna razlika u sadržaju diacilglicerola (mrlja 2), slobodnih masnih kiselina (mrlja 6) i triacilglicerola (mrlja 8) između divljeg soja (R-1) i petit mutanata (RD-1) ćelija pekarskog kvasca.

Zbog ove značajne razlike u sadržaju triacilglicerola i masnih kiselina između ćelija divljeg soja i petit mutanata, izvršena je dalja analiza ovih komponenti gasnom hromatografijom (slike 22 i 23).

Gasnom hromatografijom razdvojeni su triacilgliceroli prema molskim masama. Rezultati sastava triacilglicerola u ćelijama petit mutanta (RD-1) pokazuju da je udeo triacilglicerola sa nižim molskim masama (C_{30} i C_{32}), približno jednak kao i u divljem soju (R-1). Međutim, smanjen je udeo sadržaja triacilglicerola sa višim molskim masama (C_{34} - C_{40}) u petit mutantima u odnosu na divlji soj, a povećan kod triacilglicerola visokim molskim masama (C_{42} - C_{54}) izuzev C_{46} (slika 22).

Sadržaj masnih kiselina koje ulaze u sastav triacilglicerola analiziran je takodje gasnom hromatografijom i prikazan je na histogramu (slika 23). Sa histograma se vidi da je udeo nižih masnih kiselina C_{10} i C_{12} približno jednak divljem soju, dok je niži udeo masnih kiselina C_{16} , C_{18} i $C_{18:1}$. Udeo masnih kiselina $C_{16:1}$ u petit mutantima (RD-1) veći je u odnosu na divlji soj (R-1). Udeo nezasićenih masnih kiselina kod petit mutanta (RD-1) iznosi 70%, a kod divljeg soja 50%.

Tabela XII - Testiranje razlike sadržaja neutralnih lipida između kontrolnog uzorka (R-1) i petit mutanta (RD-1) t-testom

| Mrlja | ug neutralnih lipida (računato na holesterol) | | t | p | Značaj razlike |
|-------|--|-----------------------|-------|-------|-------------------|
| | $\bar{X}_R \pm SD$ | $\bar{X}_{RD} \pm SD$ | | | |
| 1 | 70,50 \pm 45,00 | 70,50 \pm 0,50 | 2,322 | 2,920 | NS |
| 2 | 125,75 \pm 30,93 | 336,50 \pm 33,98 | 0,924 | 0,906 | S |
| 3 | 66,66 \pm 37,18 | 68,00 \pm 30,00 | 2,749 | 2,776 | NS |
| 4 | 122,75 \pm 76,58 | 196,25 \pm 60,63 | 0,673 | 0,718 | NS |
| 5 | 96,00 \pm 19,95 | 106,25 \pm 20,49 | 2,362 | 2,447 | NS |
| 6 | 93,00 \pm 55,19 | 133,00 \pm 26,19 | 0,727 | 0,718 | S |
| 7 | 93,00 \pm 47,27 | 98,75 \pm 29,03 | 0,179 | 0,718 | NS |
| 8 | 144,33 \pm 16,56 | 463,33 \pm 47,31 | 3,586 | 3,495 | S |
| 9 | 205,00 \pm 95,00 | 235,00 \pm 70,00 | 2,797 | 2,920 | NS |
| 10 | 261,50 \pm 69,00 | 271,50 \pm 91,54 | 1,219 | 1,440 | NS |

\bar{X}_R = Srednja vrednost sadržaja lipida iz ekstrakta divljeg soja pekarskog kvasca (R-1)

\bar{X}_{RD} = srednja vrednost sadržaja lipida iz ekstrakta petit ćelija (RD-1)

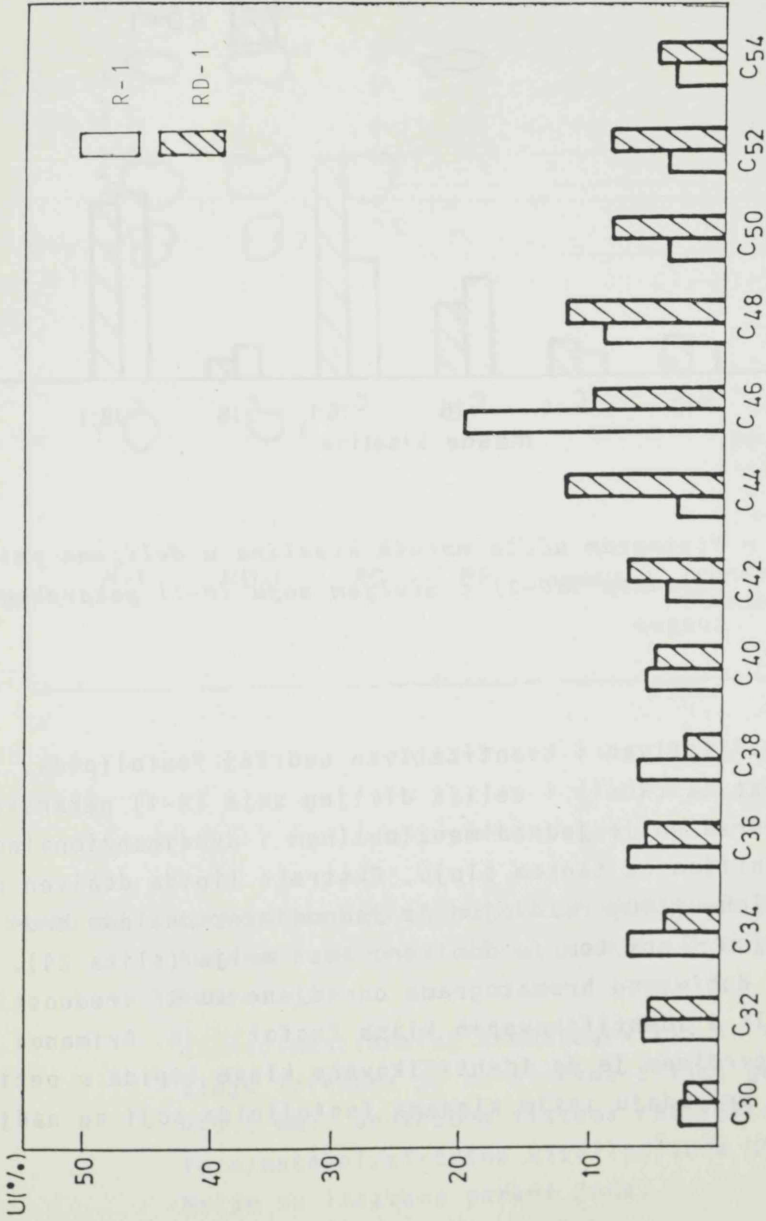
SD = standardna devijacija

NS = nije značajna razlika

S = značajna razlika

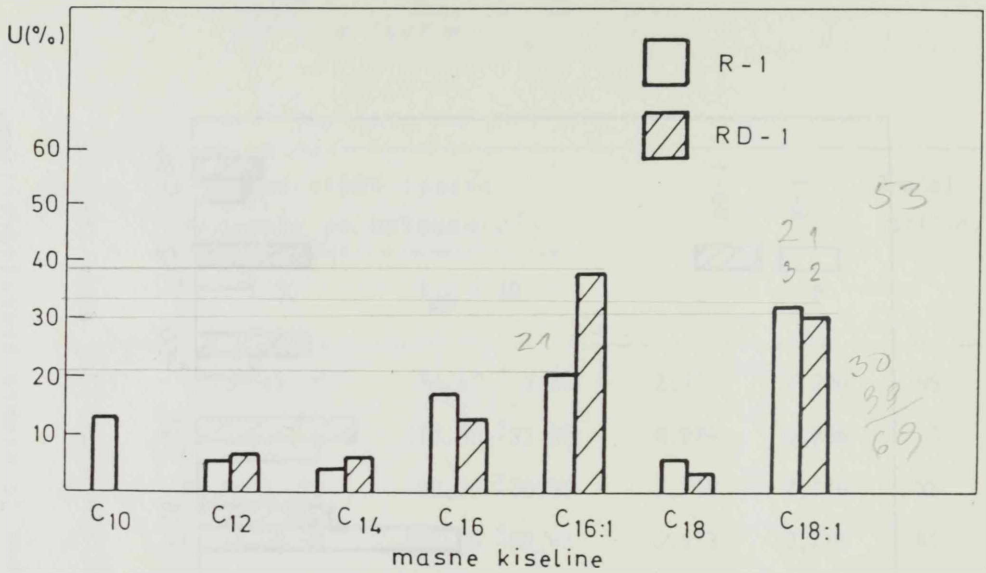
t = izračunata vrednost

p = stepen verovatnoće



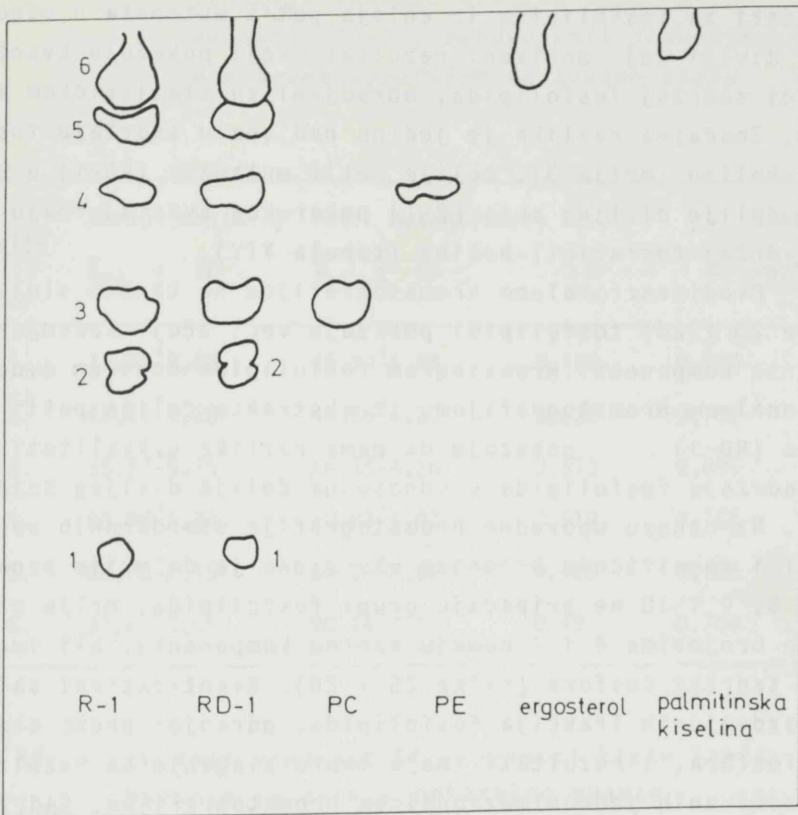
Stika 22 - Zastupljenost triacilglicerola u ćelijama divljeg soja (R-1) i peti mutanata (RD-1).

Razdvajanje triacilglicerola izvedeno je gasnom hromatografijom, prema molskim masama.



Slika 23 - Histogram udela masnih kiselina u ćelijama petit mutanata (RD-1) i divljem soju (R-1) pekarskog kvasca

Kvalitativan i kvantitativan sadržaj fosfolipida, petit mutanata (RD-1) i ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, određen je jednodimenzionalnom i dvodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju. Ekstrakt lipida dobiven po metodi Folcha (140) razdvojen je jednodimenzionalnom hromatografijom i pri tom je dobiveno šest mrlja (slika 24). Na osnovu dobivenog hromatograma određene su R_f vrednosti razdvojenih i identifikovanih klasa fosfolipida. Primenom t-testa utvrđeno je da identifikovane klase lipida u petit mutantima pripadaju istim klasama fosfolipida koji su nadjeni



Slika 24 - Hromatogram fosfolipida iz ekstrakta ćelija *petit mutanata* (RD-1) i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca

Jednodimenzionalna hromatografija na tankom sloju izvedena je na pločama Silica gela H(0,5 mm), upotrebom sistema razvijaa hloroform/metanol/sirćetna kiselina/voda (25:15:4:2). Mrlje su izazvane parama joda.

i u divljem soju (tabela XIII). Na osnovu dobivenih rezultata (tabela XIII) vidi se da nema značajnih razlika Rf vrednosti za fosfolipide iz ćelija petit mutanata u odnosu na divlji soj. Dobiveni rezultati koji pokazuju kvantitativni sadržaj fosfolipida, obradjeni su statističkom metodom. Značajna razlika je jedino nadjena u sadržaju fosfatidil-holinu (mrlja 3). Ćelije petit mutanata (RD-1) u odnosu na ćelije divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, imaju manji sadržaj fosfatidil-holina (tabela XIV).

Dvodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju (slike 25 i 26) fosfolipidi pokazuju veći broj razdvojenih lipidnih komponenti. Hromatogram fosfolipida dobiven dvodimenzionalnom hromatografijom, iz ekstrakta ćelija petit mutanata (RD-1) pokazuje da nema razlike u kvalitativnom sadržaju fosfolipida u odnosu na ćelije divljeg soja (R-1). Na osnovu uporedne hromatografije standardnih supstanci i specifičnim bojenjem utvrđeno je da mrlje označene 6, 8, 9 i 10 ne pripadaju grupi fosfolipida. Mrlje označene brojevima 4 i 7 nemaju azotnu komponentu, ali imaju visok sadržaj fosfora (slike 25 i 26). Kvantitativni sadržaj razdvojenih frakcija fosfolipida, odredjen preko sadržaja fosfora, i rezultati imaju dobro slaganje sa rezultatima dobivenih jednodimenzionalnom hromatografijom. Sadržaj fosfatidil-holina u petit mutantima, razdvojen dvodimenzionalnom hromatografijom a odredjen prema sadržaju fosfora, niži je (25 ug/100 ul ekstrakta) u poredjenju sa sadržajem u divljem soju (30 ug/100 ul ekstrakta).

Tabela XIII - Testiranje razlike Rf vrednosti fosfolipidnih frakcija izmedju divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1), razdvojenih jednodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju

| Mrlja | Divlji soj(R-1) | | Petit mutant(RD-1) | | t | Značajnost | |
|-------|-----------------|------------|--------------------|------------|-------|------------|---------|
| | \bar{X}_{Rf} | \pm SD | \bar{X}_{Rf} | \pm SD | | p | razlike |
| 1. | 15,73 | \pm 2,48 | 15,93 | \pm 1,64 | 0,150 | 0,700 | NS |
| 2. | 42,67 | \pm 4,20 | 44,56 | \pm 4,20 | 0,634 | 0,706 | NS |
| 3. | 56,67 | \pm 5,75 | 58,35 | \pm 4,26 | 0,573 | 0,695 | NS |
| 4. | 68,86 | \pm 5,26 | 70,83 | \pm 1,02 | 0,519 | 0,765 | NS |
| 5. | 85,20 | \pm 2,15 | 84,98 | \pm 2,66 | 0,128 | 0,706 | NS |
| 6. | 91,69 | \pm 3,55 | 90,74 | \pm 2,55 | 0,49 | 0,700 | NS |

\bar{X}_{Rf} = srednja vrednost Rf vrednosti klase lipida ekstrahovanih iz ćelija pekarskog kvasca

SD = standardna devijacija

NS = nije značajna razlika

t = izračunata vrednost

p = stepen verovatnoće

Tabela XIV - Testiranje razlike sadržaja fosfolipidnih frakcija između ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca, razdvojenih jednodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju

| Mrlja | S a d r ž a j ug fosfolipida, obračunato na holesterol (ug) | | | | Značajnost razlike | |
|-------|---|----------------------------|-------|-------|-----------------------|--|
| | $\bar{x}_R \pm SD$ | $\bar{x}_{RD} \pm SD$ | t | p | | |
| 1. | 425,00 [±] 19,00 | 421,00 [±] 2,00 | 0,209 | 0,816 | NS | |
| 2. | 701,00 [±] 7,00 | 653,00 [±] 64,00 | 0,746 | 0,816 | NS | |
| 3. | 694,00 [±] 10,00 | 667,00 [±] 7,00 | 0,938 | 0,816 | S | |
| 4. | 525,00 [±] 5,00 | 540,35 [±] 5,00 | 0,813 | 0,816 | NS | |
| 5. | 725,50 [±] 27,50 | 665,50 [±] 68,50 | 0,913 | 0,816 | NS | |
| 6. | 673,50 [±] 10,50 | 495,50 [±] 139,50 | 1,272 | 1,061 | S | |

\bar{x}_R = Srednja vrednost sadržaja lipidne frakcije dobivene iz ekstrakta ćelija divljeg soja (R-1)

\bar{x}_{RD} = srednja vrednost sadržaja lipidne frakcije dobivene iz ekstrakta ćelija petit mutanta (RD-1)

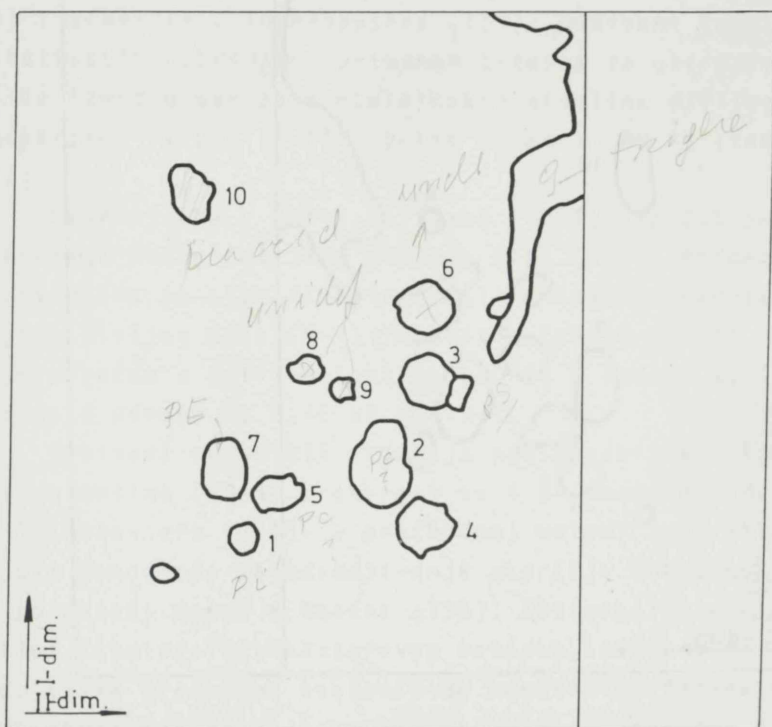
SD = standardna devijacija

NS = nije značajna razlika

S = značajna razlika

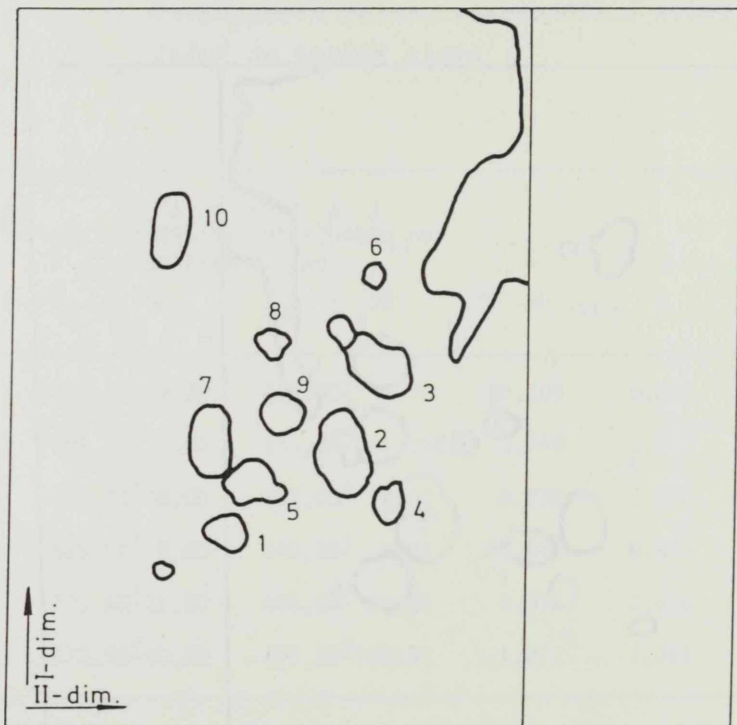
t = izračunata vrednost

p = stepen verovatnoće



Slika 25 - Hromatogram fosfolipida iz ekstrakta ćelija divljeg soja (R-1), dobivenog dvodimenzionalnom hromatografijom na tankom sloju

100 μ l ekstrakta, naneto je na ploču Silica gel G 60 (0,25 mm); prva dimenzija je razvijena u hloroformu, a zatim u istom pravcu u sistemu razvijaača hloroform/metanol/7 mol l^{-1} amonijumhidroksida (65:30:4). Druga dimenzija u sledećem sistemu razvijaača hloroform/metanol/sirćetna kiselina/voda (170:25:25:4). Mrlje su izazvane parama joda.



Slika 26 - Hromatogram fosfolipida iz ekstrakta ćelija *petit* mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

Dvodimenzionalna hromatografija na tankom sloju izvedena je na pločama Silica gel G 60 (0,25 mm) upotrebom sistema razvijača za prvu dimenziju: hloroform, zatim u istom pravcu hloroform/metanol/7 mol l⁻¹ amonijumhidroksid (65:30:4) i druga dimenzija: hloroform/metanol/sirćetna kiselina/voda (170:25:25:4). Mrlje su izazvane parama joda.

5. SADRŽAJ NUKLEINSKIH KISELINA U ČELIJAMA PEKARSKOG KVASCA

Sadržaj nukleinskih kiselina u petit mutantima (RD-1) pekarskog kvasca odredjen je primenom metoda Ogur i Rosena (150) i Schmidta i Thannhausera (151). Dobiveni rezultati su statistički obradjeni primenom t-testa za utvrđivanje razlike izmedju sadržaja nukleinskih kiselina divljeg soja pekarskog kvasca (R-1) i petit mutanta (RD-1) (tabele XV i XVI).

Sadržaj RNA u petit ćelijama (RD-1) oko 20% je niži od sadržaja RNA u ćelijama divljeg soja (R-1). Primenom t-testa utvrđena je signifikantna razlika izmedju sadržaja DNA u ćelijama divljeg soja (R-1) i petit mutanata (RD-1). Sadržaj DNA je povećan u petit mutantima (RD-1) i iznosi 9,00 ug DNA/mg proteina u odnosu na 5,76 ug kod R-1.

Dobiveni rezultati sadržaja nukleinskih kiselina u petit mutantima (RD-1) provereni su i primenom metode Schmidta i Thannhausera (151). U prethodnoj metodi upotrebljen je ćelijski homogenat za odredjivanje sadržaja nukleinskih kiselina po metodi Ogura i Rosena (150). Ekstrakcija nukleinskih kiselina Schmidt-Thannhauserovom metodom izvedena je sa celim ćelijama prethodno osušenim do konstantne težine a sadržaj NK obračunat na mg suve mase kvasca. Tabela XVI pokazuje statistički obradjene rezultate sadržaja nukleinskih kiselina u petit mutantima (RD-1) ćelija pekarskog kvasca primenom ove metode. Iz tabele se vidi da je sadržaj RNA petit mutanata (RD-1) niži u odnosu na sadržaj RNA u divljem soju (R-1) i da je razlika statistički značajna. I ovom metodom dobiveni su slični rezultati o povećanom sadržaju DNA u ćelijama petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca. Karakteristični odnos RNA/DNA je dva puta niži kod petit mutanata u poredjenju sa uzorkom divljeg soja.

Tabela XV - Testiranje razlike između sadržaja nukleinskih kiselina divljeg soja pekarskog kvasca (R-1) i petit mutanta (RD-1)

| Nukleinske kiseline | Sadržaj nukleinskih kiselina (ug NK/mg proteina) | | | |
|---------------------|--|---------------------------|------|-------|
| | $\bar{X}_R \pm SD$ | $\bar{X}_{RD} \pm SD$ | t | p |
| RNA | 158,40 [±] 8,477 | 126,07 [±] 12,83 | 5,15 | 0,001 |
| DNA | 5,76 [±] 2,00 | 9,00 [±] 0,5 | 4,80 | 0,05 |
| RNA/DNA | 27,50 | 14,20 | | |
| NK | 164,16 | 135,07 | | |

\bar{X}_R = srednja vrednost sadržaja NK u ćelijama divljeg soja (R-1)

\bar{X}_{RD} = srednja vrednost sadržaja NK u ćelijama petit mutanta (RD-1) ćelija pekarskog kvasca

SD = standardna devijacija

t = izračunata vrednost

p = stepen verovatnoće

Tabela XVI - Testiranje razlike između sadržaja nukleinskih kiselina divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) ćelija pekarskog kvasca, primenom Schmidt-Thannhauserove metode

| Nukleinske | Sadržaj nukleinskih kiselina (ug NK/mg suve mase kvasca) | | | |
|------------|--|-----------------------|-----|------|
| | $\bar{X}_R \pm SD$ | $\bar{X}_{RD} \pm SD$ | t | p |
| RNA | 62,72 \pm 1,81 | 45,12 \pm 0,45 | 8,8 | 0,05 |
| DNA | 3,00 \pm 0,03 | 3,84 \pm 0,01 | 4,7 | 0,05 |
| RNA/DNA | 20,9 | 11,7 | | |
| NK | 65,72 | 48,96 | | |

\bar{X}_R = srednja vrednost sadržaja NK u ćelijama divljeg soja (R-1)

\bar{X}_{RD} = srednja vrednost sadržaja NK u ćelijama petit mutanta (RD-1) ćelija pekarskog kvasca

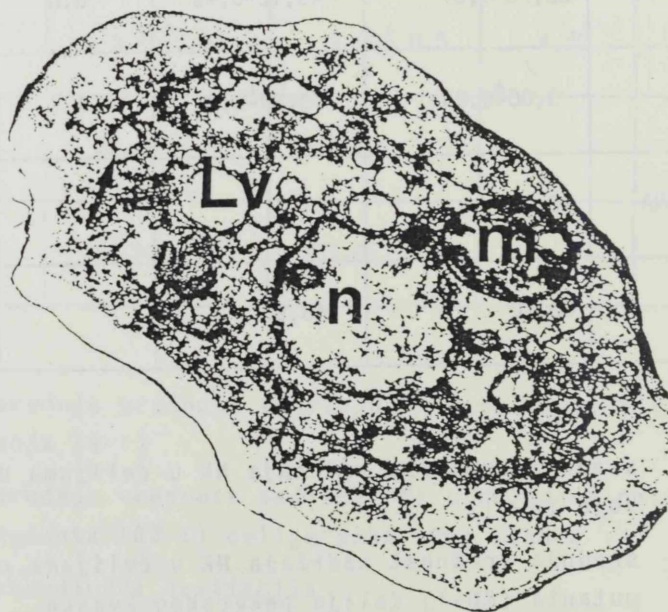
SD = standardna devijacija

t = izračunata vrednost

p = stepen verovatnoće

6. MORFOLOGIJA ČELIJE PEKARSKOG KVASCA I NJENIH KONSTITUENATA

Morfologija petit ćelija (RD-1) i divljeg soja (R-1) određena je iz preseka ćelije a na osnovu analize elektronskim mikroskopom. Sa slike 27 vidi se ćelija kontrolnog uzorka (divlji soj) kao i svi ćelijski konstituenti (jedro, mitohondrije, ćelijske vakuole, ćelijski zid kao i gustina poliribozoma). Na slici 28 prikazan je mikrograf petit ćelije.



Slika 27 - Elektron-mikrograf ultratankih preseka ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca (uveličanje 55000): r - ribozomi, L - lipidne vakuole, N - jedro, m - mitohondrije

Poredjenjem dobivenih mikrografa (slike 27 i 28) vidi se značajna razlika kako u veličini petiti ćelije tako i u njenom obliku. Petiti ćelija je značajno veća od normalne ćelije i "flašastog" je izgleda. Unutar ćelije vakuola zauzima gotovo svu zapreminu ćelije, usled čega je citoplazma u obliku oreola između ćelijskog zida i vakuole. Ćelijski zid je takodje izmenjen kod petiti mutanta. Pored uvećane ćelije petiti mutanta, uočava se i znatno veća hromatinska masa, dok je gustina poliribozoma znatno niža (slika 30).

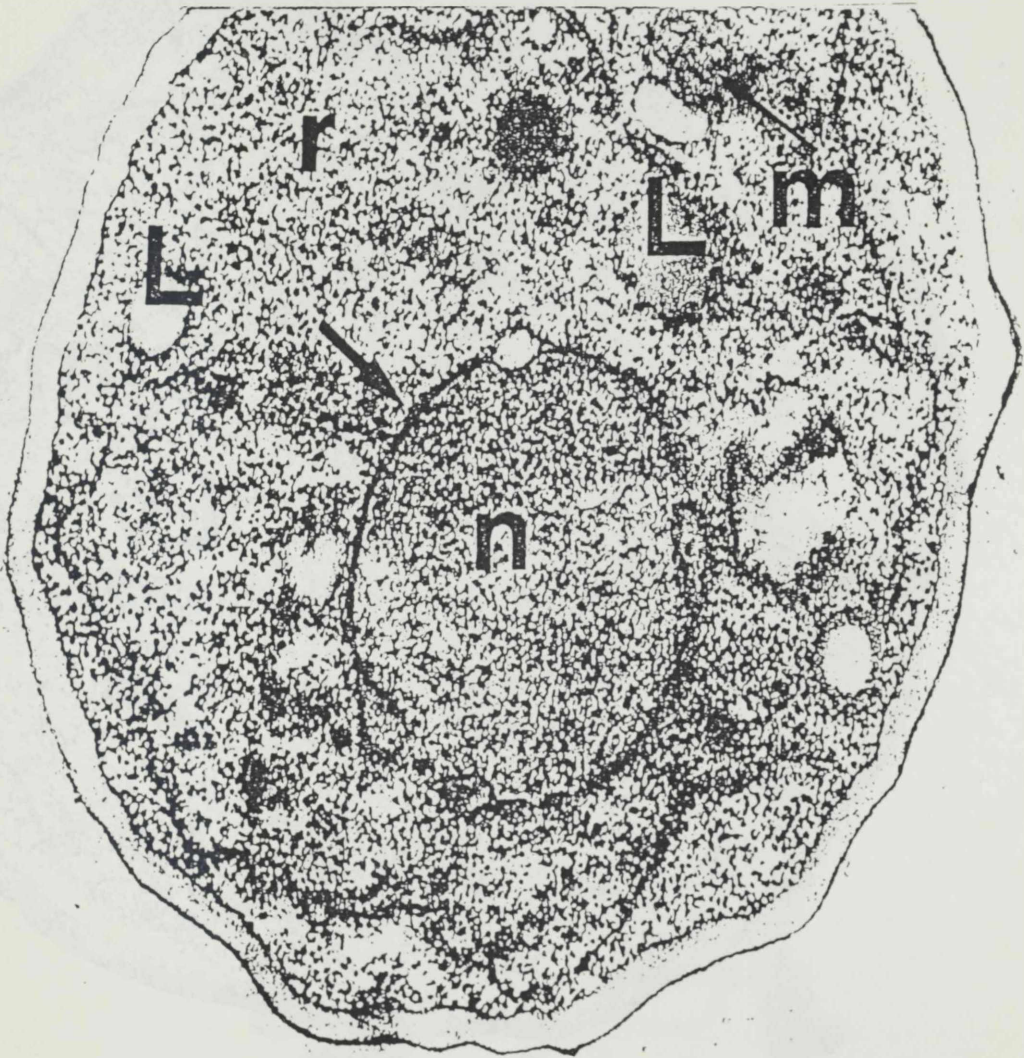


Slika 28 - Elektron-mikrograf ultratankih delova celih celija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca: r - ribozomi, m - mitohondrije, N - jedro, Lv - lipidna vakuola

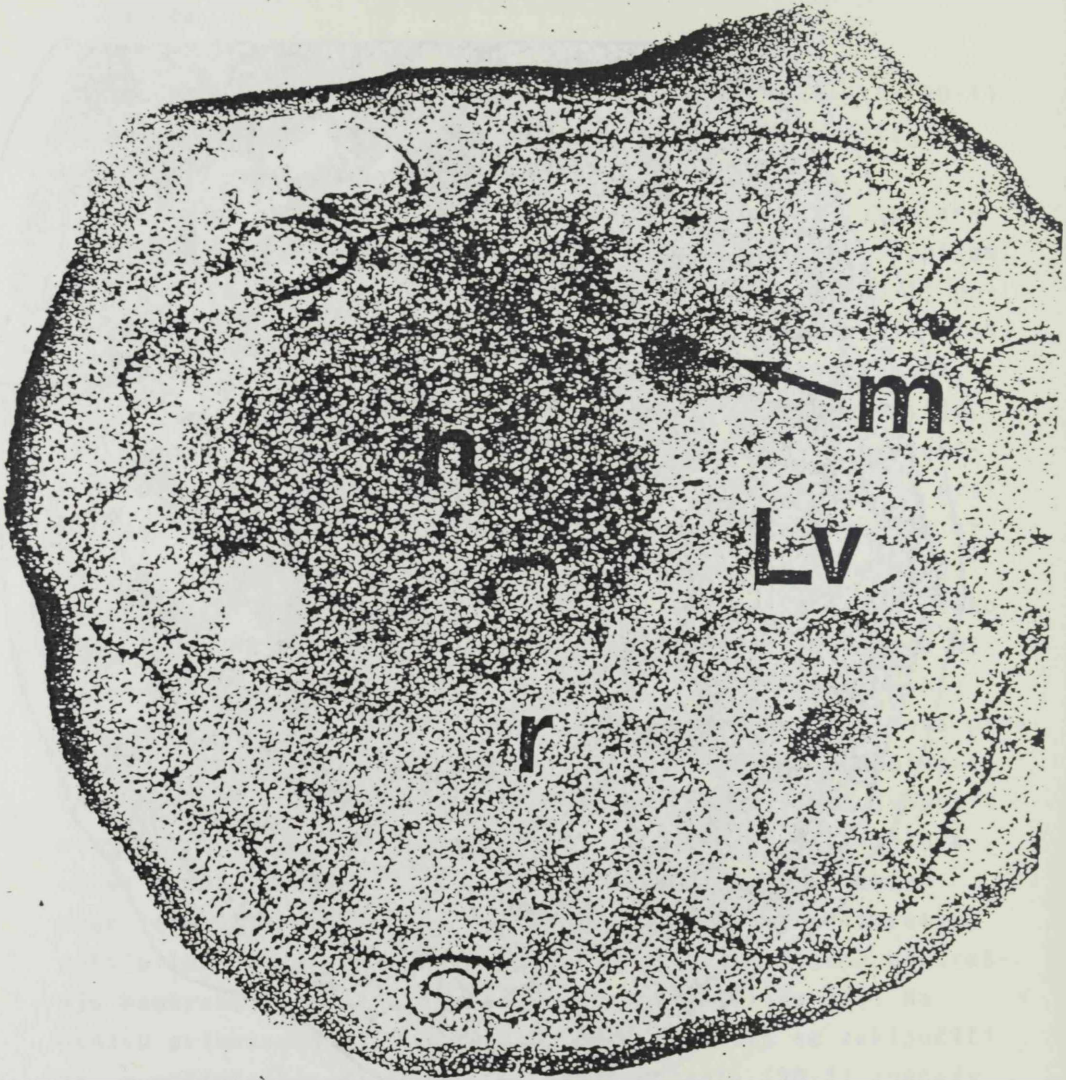
7. STRUKTURA I FUNKCIJA MITOHONDRIJA IZ ČELIJA PEKARSKOG KVASCA

Struktura i funkcija mitohondrija petit mutanta (RD-1) ćelija pekarskog kvasca ispitana je sa aspekta morfologije, funkcije i hemijskog sastava.

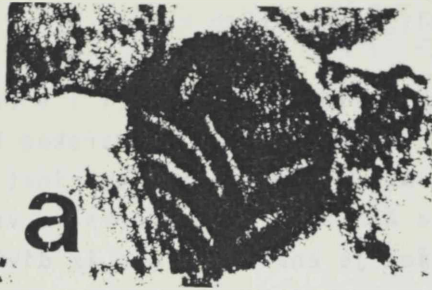
Morfologija mitohondrija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca izvršena je *in situ*, elektronskom mikroskopijom iz ultratankih preseka celih ćelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca (slike 29 i 30). Na slici 29 prikazan je elektron-mikrograf ćelije divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, koji pokazuje tipičan mitohondrijski profil aerobne ćelije, dok elektron-mikrograf ćelije petit mutanta (RD-1) ne pokazuje istu sliku. Dalja analiza morfologije mitohondrija petit mutanta izvedena je ispitivanjem izolovanih mitohondrija iz ćelija pekarskog kvasca. Mitohondrije iz ćelija pekarskog kvasca izolovane su po metodi Cobona i saradnika (133), kako smo već opisali u odeljku - Materijal i metode. Dobivena mitohondrijska frakcija podvrgnuta je elektron-mikroskopskoj analizi kako celih mitohondrija tako i ultratankih delova presečenih mitohondrija (slike 31 i 32). Mitohondrije dobivene iz ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca pokazuju oblik mitohondrija kao što je dobiveno i za mitohondrije izolovane iz tkiva. Dobivene mitohondrije pokazuju visok stepen energisanosti membrane, dok mitohondrije dobivene iz petit ćelija (RD-1) pekarskog kvasca imaju slabo razvijenu unutrašnju membranu i nizak stepen energisanosti (slika 32). Na osnovu prikazanih slika (29, 30, 31 i 32) može se zaključiti da je morfologija mitohondrija petit mutanta (RD-1) značajno izmenjena i da pokazuje oblik promitohondrija.



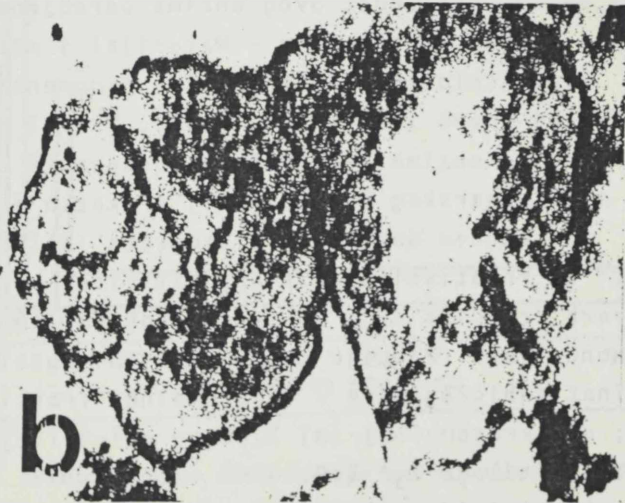
Slika 29 - Elektron-mikrograf ultratankih preseka celih ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca sa tipičnim mitohondrijskim profilom (uveličanje 45000)



Slika 30 - Elektron-mikrograf ultratankih preseka celih
ćelija petit (RD-1) mutanta pekarskog kvasca
(uveličanje 45000)



Slika 31 - Elektron-mikrograf ultratankih preseka izolovanih mitohondrija iz ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca (uveličanje 80000 a) oblik zrelih mitohondrija



Slika 32 - Elektron-mikrograf ultratankih preseka izolovanih mitohondrija iz ćelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca (uveličanje 100000 b) promitohondrijski oblik

7.1. Analiza enzima kompleksa II i V respiratornog lanca ćelija pekarskog kvasca

Analiza enzima kompleksa II i V respiratornog lanca ćelija petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca izvedena je odredjivanjem aktivnosti enzima sukcinat dehidrogenaze i mitohondrijske ATP-aze. Kao referentna vrednost za ove enzime upotrebljen je enzim dobiven iz divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.

7.1.1. Intracelularna distribucija enzima sukcinat dehidrogenaze

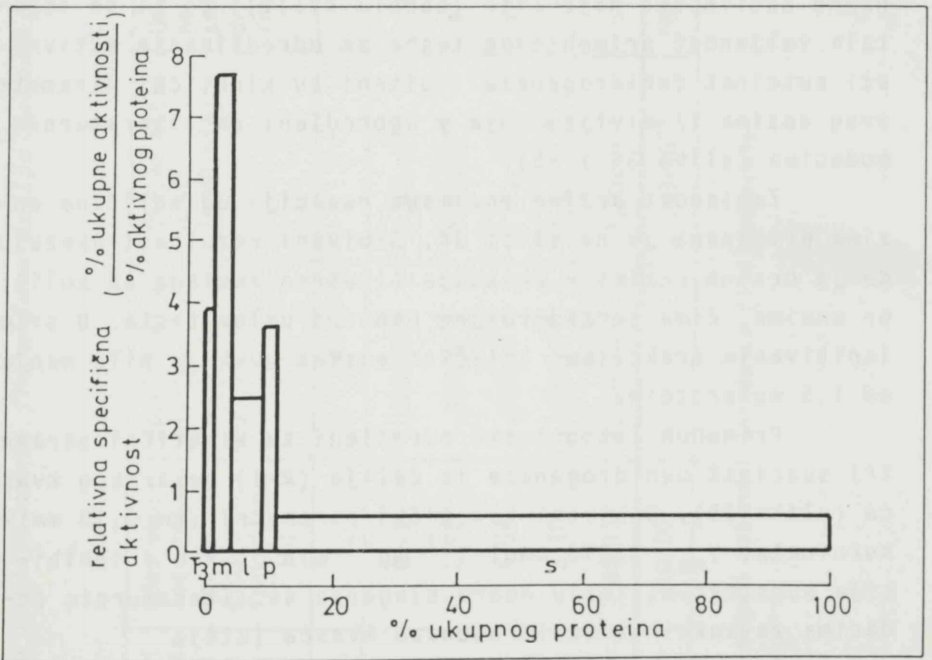
Poznati marker enzima za mitohondrijsku frakciju, pored citohrom oksidaze je sukcinat dehidrogenaza EC (1.33.99.1). Aktivnost ovog enzima odredjena je na način koji je opisan u poglavlju - Materijal i metode.

Intracelularna distribucija ovog enzima ispitana je metodom De Duvea i saradnika (145). Profil intracelularne distribucije enzima sukcinat dehidrogenaze u ćelijama divljeg soja pekarskog kvasca (R-1) prikazan je na slici 33.

Na osnovu dobivenog histograma (slika 33), može se videti da relativni specifični aktivitet vrednosti 7,86 odgovara frakciji koja po metodi Cobona (133) predstavlja mitohondrijsku frakciju (m). Relativni specifični aktivitet sukcinat dehidrogenaze u lipozomalnoj frakciji (l) iznosi 2,53; u mikrozomalnoj (p) 3,66; u solubilnoj frakciji (s) 0,66; i u talogu T_3^* 3,9.

Dobiveni rezultati ukazuju da frakcija izdvojena na 12.000 g 10 minuta u izotoničnom medijumu predstavlja

* Talog T_3 po metodi Cobona i saradnika (133) treba odbaciti. Uzet je u razmatranje samo zbog ukupnog bilansa proteina i ispitivanih enzima (ATP-aze i sukcinat dehidrogenaze).



Slika 33 - Profil intracelularne distribucije enzima suksinat dehidrogenaze u ćelijama divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca

Intracelularna distribucija izvedena je metodom De Duvea (145). Test-sistem za određivanje ovog enzima sadrži: 40 mmol/l fosfatnog pufera, pH 7,5, 0,25 mmol/l CaCl_2 , 0,4 mmol/l KCN, 0,013 mg/ml 2,6-dihlorindofenol i 2 mg/ml fenazin metasulfat i 16 mmol/l suksinata.

mitohondrijsku frakciju sa visokim relativnim specifičnim aktivitetom od 7,86.

Udeo proteina po izdvojenim frakcijama izražen u procentima u odnosu na ukupni protein (homogenata ili suma proteina u frakcijama označena kao 100%) prikazan je u tabeli XVII. Slična distribucija proteina po organelama odredjena je i za ćelije petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca (tabela XVIII).

U svim testiranim frakcijama dobivenim iz ćelija petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca sukcinat dehidrogenazne aktivnosti nije bilo (tabela XVIII). Da bi se ispitala valjanost primenjenog testa za odredjivanje aktivnosti sukcinat dehidrogenaze ispitani su kinetički parametri ovog enzima iz divljeg soja i upoređeni sa literaturnim podacima (slike 34 i 35).

Zavisnost brzine enzimske reakcije od količine enzima prikazana je na slici 34. Dobiveni rezultati ukazuju da je brzina enzimske reakcije linearno zavisna od količine enzima, čime je zadovoljen osnovni uslov testa. U svim ispitivanim frakcijama količina enzima uvek je bila manja od 1,5 mg proteina.

Primenom istog testa odredjeni su kinetički parametri sukcinat dehidrogenaze iz ćelija (R-1) pekarskog kvasca (slika 35). Dobiveni kinetički parametri (K_m 0,18 ml/l sukcinata, V_{max} 0,018 mmol l⁻¹ mg⁻¹ min⁻¹) kao i inhibicija supstratom, imaju dobro slaganje sa literaturnim podacima za sukcinat dehidrogenazu kvasca (214).

Svi ovi rezultati ukazuju da je primenjeni test ispravan, ali negativni rezultati kod petit mutanata ukazuju na odsustvo ovog enzima ili njegove inaktivacije, koja je nastala usled mutacije.

Ćelije petit mutanata (RD-1) koje imaju oštećen respiratorni lanac (nedostatak citohroma aa₃ i sukcinat dehidrogenaza) imaju sposobnost redukcije 2,6-dihlorindofenol i fenezin metasulfata (slika 36). Brzina ove reakcije je upravo proporcionalna količini proteina. Ovu

Tabela XVII - Distribucija proteina i specifičnog aktiviteta sukcinat dehidrogenaze u subcelularnim frakcijama ćelija pekarskog kvasca (R-1)

| Frakcija | Ukupni protein (mg) | Udeo ukupnog proteina po izdvojenim frakcijama (%) | Specifični aktivitet (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Ukupna aktivnost (mmol/min) | Udeo ukupne aktivnosti po izdvojenim frakcijama (%) | Relativni specifični aktivitet |
|--------------------|---------------------|--|---|-----------------------------|---|--------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| T ₃ -R | 0,60 | 0,76 | 1,076x10 ⁻⁴ | 6,45x10 ⁻⁵ | 2,95 | 3,88 |
| mitohondrijska (m) | 2,39 | 2,78 | 1,998x10 ⁻⁴ | 4,77x10 ⁻⁴ | 21,87 | 7,86 |
| tipozomalna (l) | 3,89 | 4,94 | 7,028x10 ⁻⁵ | 2,73x10 ⁻⁴ | 12,50 | 2,53 |
| mikrozomska (p) | 1,45 | 2,10 | 1,160x10 ⁻⁴ | 1,68x10 ⁻⁴ | 7,69 | 3,66 |
| solubilna (s) | 70,00 | 89,13 | 1,726x10 ⁻⁵ | 1,20x10 ⁻³ | 54,97 | 0,62 |
| Ukupno | 78,33 | 100,00 | | 21,83x10 ⁻⁴ | 100,00 | |

* T₃ - talog koji se po metodi Cobona i saradnika (133) odbacuje

reakciju inhibira KCN i dovodi je na nultu vrednost pri 3,25 mmol/l KCN (slika 37). Ovakav oksido-redukcioni mehanizam nemaju ćelije divljeg soja pekarskog kvasca.

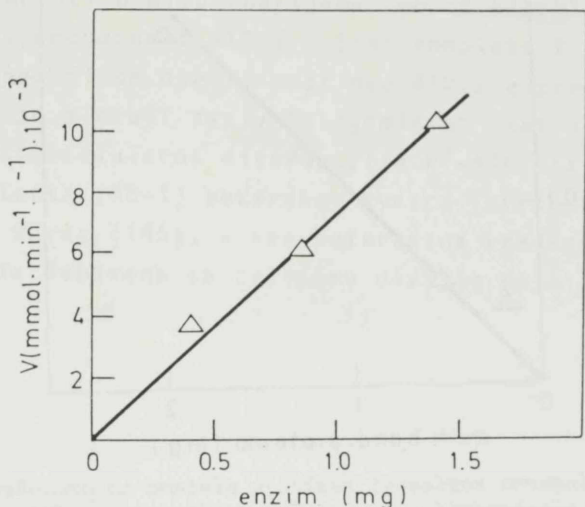
Tabela XVIII - Distribucija proteina subcelularnih frakcija dobivenih iz petit mutanata pekarskog kvasca

| Frakcija | Ukupni protein (mg) | Udeo ukupnog proteina po izdvojenim frakcijama (%) | Specifični aktivitet (mmol/min ⁻¹ mg ⁻¹) sukcinat dehidrogenaze |
|---------------------|---------------------|--|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| T ₃ -RD* | 0,90 | 1,47 | - |
| mitochondrije(m) | 1,88 | 3,07 | - |
| lipozomi (l) | 1,98 | 3,23 | - |
| mikrozomi (p) | 1,60 | 2,61 | - |
| solubilna (s) | 54,80 | 89,60 | - |
| Ukupno | 61,16 | 100 | - |

T₃* - talog se po metodi Cobone i saradnika (133) odbacuje

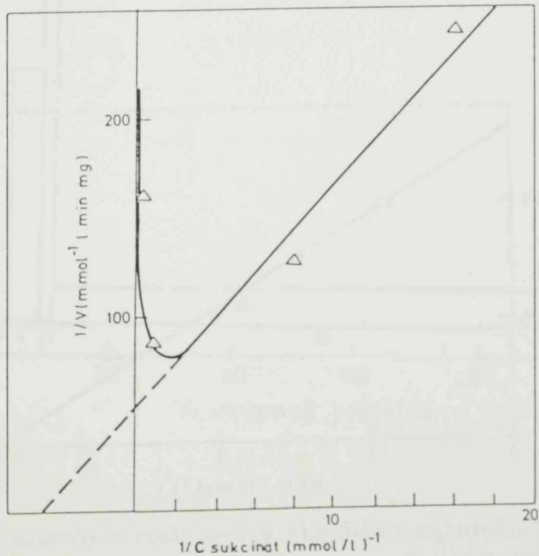
7.1.2. Distribucija i aktivnost ATP-aze u ćelijama pekarskog kvasca

Ćelije kvasca i plesni sadrže tri tipa H⁺-ATP-aze: mitochondrijsku, ATP-azu plazma membrane i ATP-azu membrana vakuola. Sva tri tipa enzima imaju sposobnost hidrolize ATP-a. One se medjusobno razlikuju prema pH optimumu i prema aktivirajućem dejstvu jona Mg. Druga značajna razlika je prema delovanju inhibitora, kao što su oligomicin i azid. ATP-aza



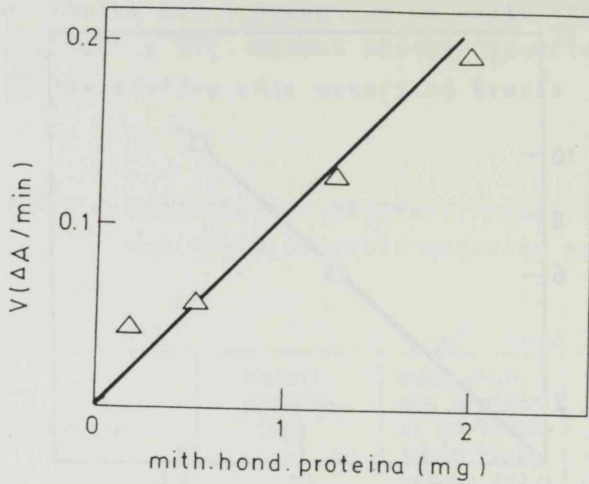
Slika 34 - Zavisnost brzine enzimske reakcije sukcinat dehidrogenaze iz mitohondrija ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca

Brzina enzimske reakcije sukcinat dehidrogenaze određena je u sledećem test-sistemu: 40 mmol/l fosfatnog pufera pH 7,5, 0,26 mmol/l CaCl_2 , 0,4 mmol/l KCN, 0,013 mg/ml 2,6-dihlorindofenol, 1 mg/ml fenāzin metasulfata, 16 mmol/l sukcinata.



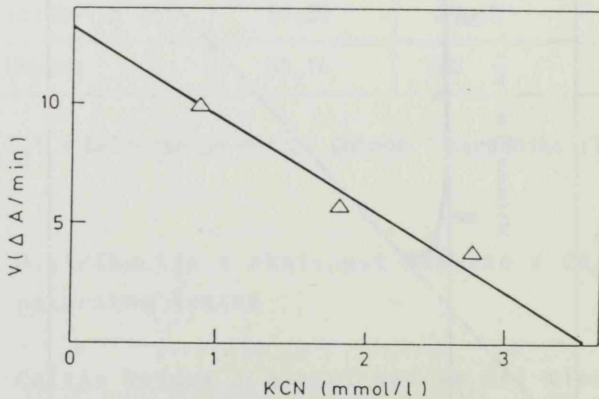
Slika 35 - Uticaj koncentracije sukcinata na brzinu enzimske reakcije sukcinat dehidrogenaze iz ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca

Primenom Lineweaver-Burkovog dijagrama određeni su kinetički parametri K_m 0,18 mmol/l sukcinat, V_{max} 0,018 mmol $l^{-1}mg^{-1}min^{-1}$



Slika 36 - Linearna zavisnost reakcije sistema za prenošenje elektrona i mitohondrijskog proteina petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

Brzina reakcije između sistema za prenošenje elektrona i proteina mitohondrija odvijana je u 40 mmol/l fosfatnom puferu pH 7,5, 0,26 mmol/l CaCl_2 , 1 mg/ml fenazinmeta-sulfat i 0,013 mg/ml 2,6-dihlorindofenol

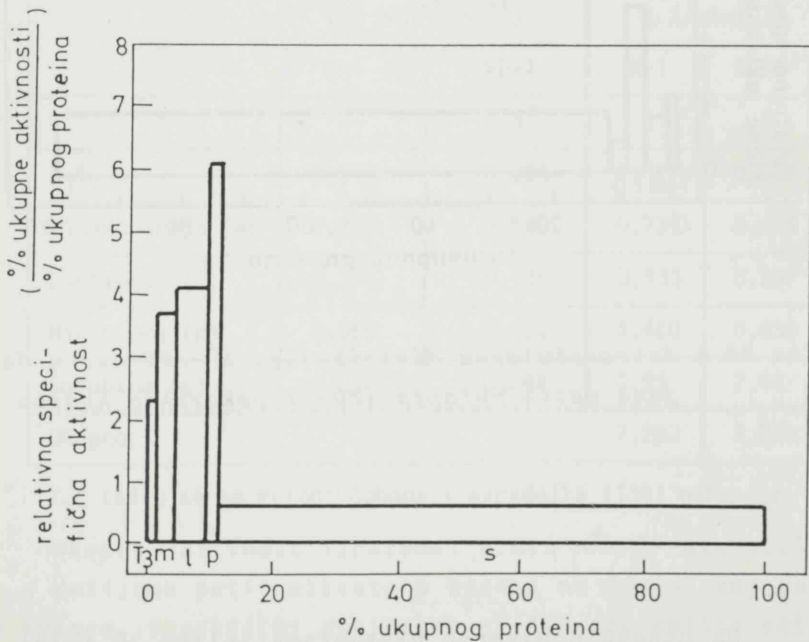


Slika 37 - Inhibicija redukcije 2,6-dihlorindofenola sa KCN

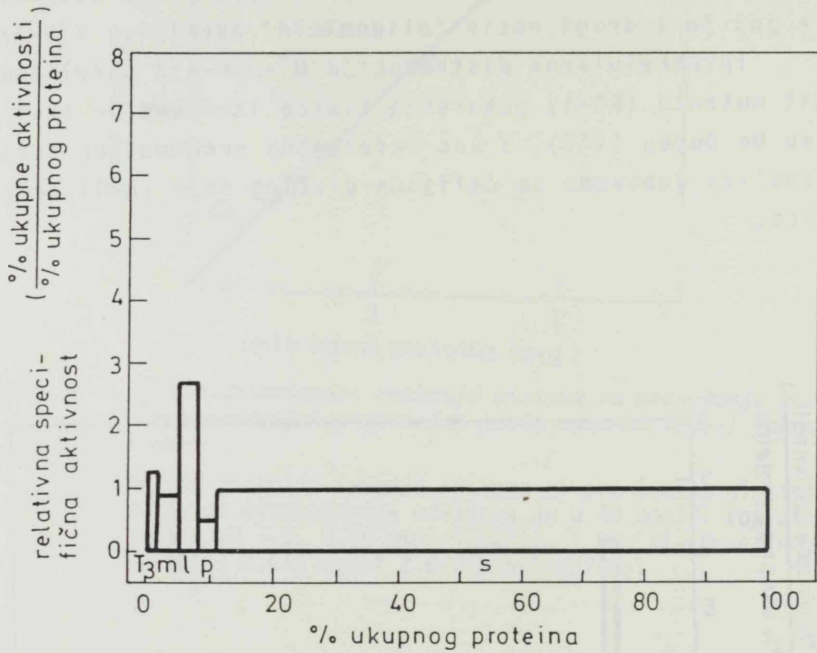
Inhibicija redukcije 2,6-dihlorindofenola izvršena je do-davanjem 0,1-0,4 ml 12 mmol/l KCN u test smesu sledećeg sastava: 40 mmol/l fosfatni pufer, pH 7,5, 0,26 mmol/l CaCl_2 , 1 mg/ml fenazin metasulfata, 0,013 mg/ml 2,6-dihlo-rindofenola, pri konstantnoj koncentraciji mitohondrijskog proteina 1,5 mg/ml.

koja se nalazi u mitohondrijama, pored hidrolize ATP-a ima i sintetsku sposobnost ATP-a i čini kompleks V u respiratornom lancu. Specifična osetljivost ove ATP-aze prema oligomicinu dala joj je i drugi naziv "oligomicin" osetljiva ATP-aza.

Intracelularna distribucija H^+ -ATP-aza u ćelijama petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca izvršena je analizom prema De Duveu (145), a kao referentna vrednost upotrebljena je analiza dobivena sa ćelijama divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.



Slika 38 - Intracelularna distribucija H^+ -ATP-aze u ćelijama divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca



Slika 39 - Intracelularna distribucija H^+ -ATP-aze u ćelijama petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

Na osnovu dobivenog histograma (slika 38 i 39) vidi se da je distribucija H^+ -ATP-aze u petit mutantima (RD-1) pekarskog kvasca različita u odnosu na distribuciju ovog enzima u divljem soju pekarskog kvasca. Najveći relativni specifični aktivitet visine 6,18 je u mikrozomalnoj frakciji (p) za divlji soj (R-1), a najviši relativni specifični aktivitet je u lipozomalnoj frakciji (l) petit mutanta (RD-1) ćelija pekarskog kvasca.

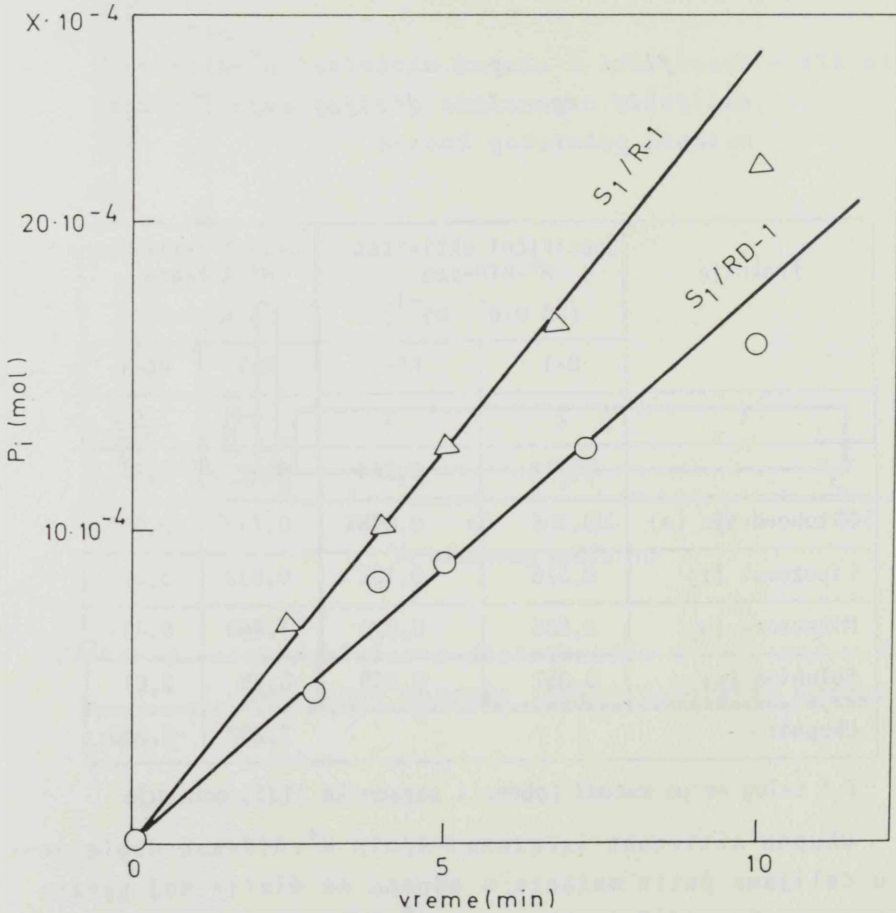
Najveći specifični aktivitet H^+ -ATP-aze pokazuje mikrozomalna frakcija (p) divljeg soja visine 0,566 $\Delta A/\text{min}$ mg, dok je najveći specifični aktivitet kod petit mutanata u lipozomalnoj frakciji (l) (tabela XIX).

Tabela XIX - Specifični i ukupni aktivitet H^+ -ATP-aze u ćelijskim organelama divljeg soja i petit mutanta pekarskog kvasca

| Frakcija | Specifični aktivitet H^+ -ATP-aze ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) | | Ukupni aktivitet H^+ -ATP-aze ($\Delta A/\text{min}$) | |
|-------------------|--|-------|--|-------|
| | R-1 | RD-1 | R-1 | RD-1 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| T_3^* | 0,213 | 0,064 | 0,127 | 0,057 |
| Mitochondrija (m) | 0,306 | 0,048 | 0,732 | 0,084 |
| Lipozomat (l) | 0,376 | 0,135 | 0,933 | 0,267 |
| Mikrozoma (p) | 0,566 | 0,024 | 1,460 | 0,033 |
| Solubina (s) | 0,057 | 0,048 | 0,95 | 2,61 |
| Ukupno: | | | 7,202 | 3,050 |

T_3^* talog se po metodi Cobona i saradnika (133) odbacuje

Ukupna aktivnost izražena $\Delta A/\text{min}$ H^+ -ATP-aze duplo je niža u ćelijama petit mutanta u odnosu na divlji soj pekarskog kvasca. Specifični aktivitet H^+ -ATP-aze ćelija petit mutanta u poredjenju sa specifičnim aktivitetom ATP-aze dobivene iz ćelija divljeg soja takodje pokazuje dva do tri puta nižu vrednost. Ova razlika dobiva se i odredjivanjem aktiviteta ATP-aze prema količini oslobodjenog fosfora (slika 40).



Slika 40 - Brzina enzimske reakcije H^+ -ATP-aze, merena preko oslobođenog fosfora

Brzina enzimske reakcije je započeta dodavanjem enzima u test smesu koja je bila sledećeg sastava: Tris-HCl pufer, 50 mmol/l, pH 8,5, 3 mmol/l $Mg Cl_2$ i 10 mmol/l ATP-a. Reakcija je u vremenskom tempu stopirana 0,5 mol/l trihlorsirćetnom kiselinom i fosfor odredjen prema Harisu i Popetu (156)

7.1.3. Kinetički parametri H^+ -ATP-aze mikrozomalne frakcije petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

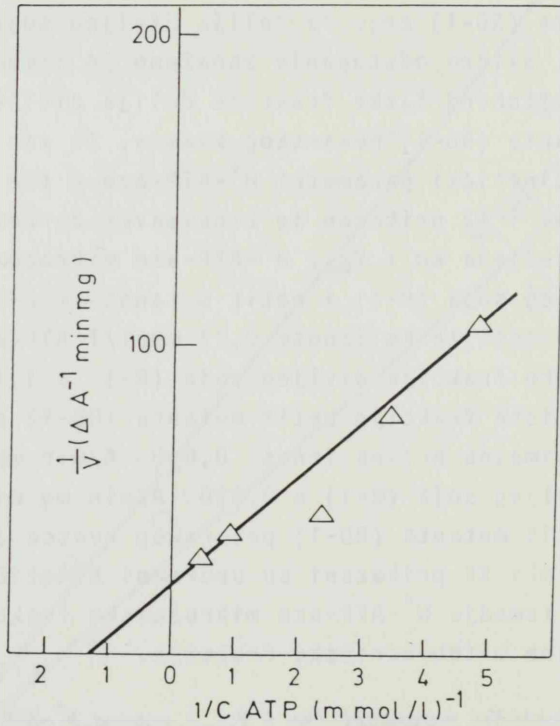
Prethodna analiza intracelularne distribucije ukupne ćelijske H^+ -ATP-aze (slike 38 i 39), pokazuje da je niža zastupljenost ovog enzima u mikrozomskoj frakciji dobivenoj iz petit mutanta (RD-1) nego iz ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca. Slično odstupanje zapaženo je između ATP-azne aktivnosti mitohondrijske frakcije ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca. Iz tih razloga određeni su kinetički parametri H^+ -ATP-aze u tim frakcijama. Na slikama 41 i 42 prikazan je Lineweaver-Burkov dijagram, kojim je određena K_m i V_{max} H^+ -ATP-aze mikrozomske frakcije ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca. Vrednosti za K_m iznose 0,77 mmol/l ATP-a za enzim iz mikrozomske frakcije divljeg soja (R-1) a 1,17 mmol/l ATP za enzim iz iste frakcije petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca. Maksimalna brzina iznosi 0,045 $\Delta A/min$ mg mikrozomskog proteina divljeg soja (R-1) a 0,020 $\Delta A/min$ mg mikrozomskog proteina petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca (tabela XX).

U tabeli XX prikazani su uporedni kinetički parametri (K_m i V_{max}) između H^+ -ATP-aze mikrozomske frakcije i H^+ -ATP-aza testirane mitohondrijske frakcije.

Tabela XX - Kinetički parametri (K_m i V_{max}) enzima H^+ -ATP-aze mitohondrijske i mikrozomske frakcije ćelija divljeg soja i petit mutanta pekarskog kvasca

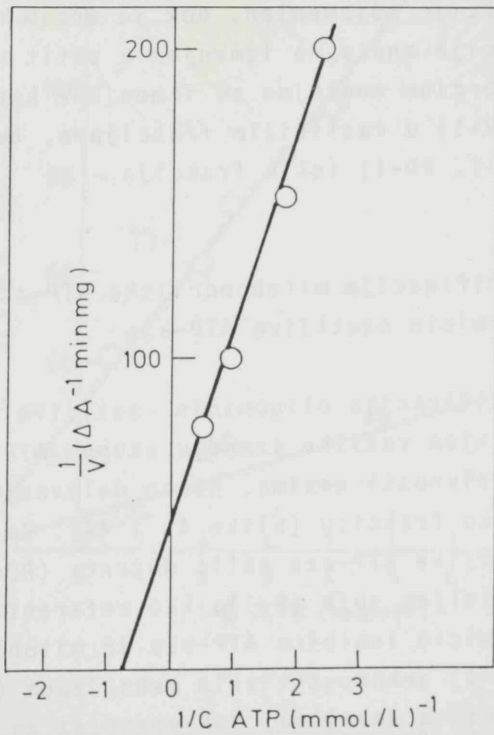
| Frakcija | K_m (mmol ATP/l) | | V_{max} ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) | |
|--------------|--------------------|--------|---|--------|
| | (R-1) | (RD-1) | (R-1) | (RD-1) |
| Mitohondrija | 0,55 | 0,47 | 0,136 | 0,050 |
| Mikrozoma | 0,77 | 1,17 | 0,045 | 0,020 |

Iz tabele XX vidi se da je vrednost za K_m enzima iz mitohondrijske frakcije približno ista i za divlji soj (R-1)



Slika 41 - Lineweaver-Burkov dijagram H^+ -ATP-aze iz mikrozo-
mske frakcije ćelija divljeg soja pekarskog kvasca
(R-1)

Brzina enzimske reakcije započeta je dodavanjem enzima, u test smesu sa rastućom koncentracijom ATP-a u sledećim uslovima: 3,2 mmol/l $MgCl_2$, 4 mmol/l Tris-HCl pufera pH 8,4 i 0,016% (m/v) fenol reda, krajnji volumen je 3 ml. Merena je promena apsorpcije na 559 nm



Slika 42 - Lineweaver-Burkov dijagram H^+ -ATP-aze iz mikrozosomske frakcije čelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

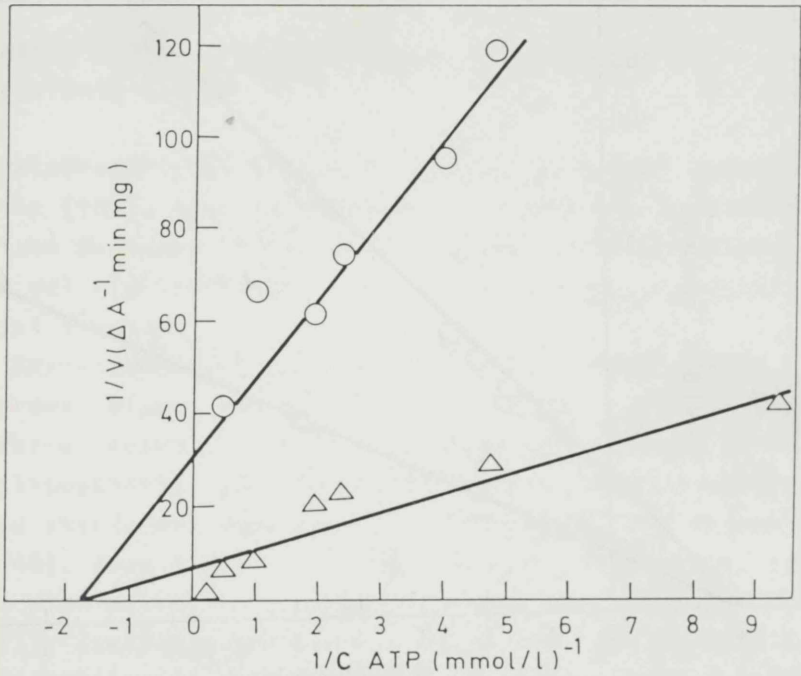
Brzina enzimske reakcije započeta je dodavanjem enzima u test smesu sa rastućom koncentracijom supstrata u uslovima 3,2 mmol/l $MgCl_2$, 4 mmol/l Tris-HCl pufera, pH 8,4 i 0,016% (m/v) fenol reda. Brzina reakcije je praćena promenom apsorpcije na 559 nm, kontinualni test

petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca i iznosi 0,55 do 0,47 mmol/l ATP-a. Mikrozoomska frakcija daje vrednosti za K_m 0,77 do 1,17 mmol/l ATP za divlji soj (R-1) odnosno mutanta (RD-1). Prema vrednostima za K_m može se zaključiti da je moguća priroda enzima u mitohondrijskoj frakciji različita od enzima u mikrozoamskoj frakciji. Sa druge strane, ako se uporede iste frakcije dobivene iz divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca, vidi se da je K_m enzima iz mitohondrijske frakcije neizmenjen, dok je enzim odbiven iz mikrozoomske frakcije značajno izmenjen u petit mutantima (RD-1). Maksimalne brzine značajno su izmenjene kako kod enzima divljeg soja (R-1) u različitim frakcijama, tako i u različitim sojevima (R-1, RD-1) istih frakcija.

7.1.4. Identifikacija mitohondrijske ATP-aze ili oligomicin osetljive ATP-aze

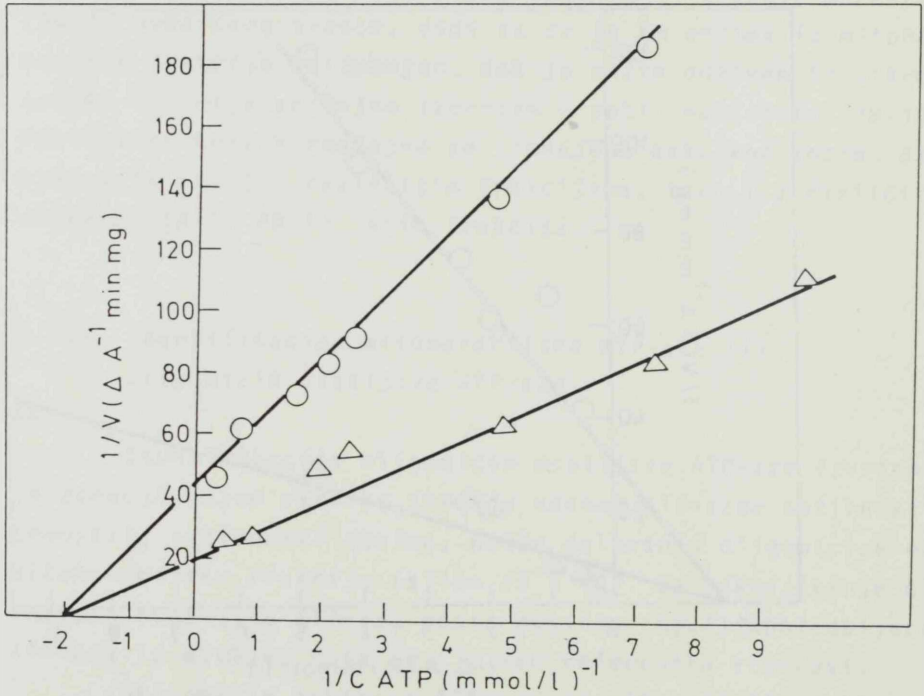
Identifikacija oligomicin osetljive ATP-aze izvršena je odredjivanjem razlike izmedju ukupne ATP-azne aktivnosti i preostale aktivnosti enzima, nakon delovanja oligomicina na mitohondrijsku frakciju (slike 43 i 44). Za odredjivanje oligomicin osetljive ATP-aze petit mutanta (RD-1) upotrebljena je ATP-aza iz divljeg soja (R-1), kao referentna vrednost.

Oligomicin inhibira ATP-azu iz mitohondrija ćelija divljeg soja (R-1) nekompetitivnim mehanizmom (slika 43), gde je maksimalna brzina smanjena, dok vrednost za K_m prema ATP-u nije izmenjena. Isti rezultati dobiveni su i za ATP-azu iz mitohondrija petit mutanta (RD-1) (slika 44). Maksimalna brzina kod divljeg soja smanjena je za 76,48% a za 54,00% kod ćelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca. Razlika koja nastaje izmedju ukupne aktivnosti i preostale aktivnosti nakon delovanja oligomicina (10 μ g) ukazuje da skoro polovina ukupne ATP-azne aktivnosti mitohondrijske frakcije potiče od oligomicin osetljive ATP-aze. Kod divljeg soja (R-1) ta razlika iznosi dve trećine oligomicin osetljive ATP-aze a samo



Slika 43 - Reakciona kinetika oligomicina sa ATP-azom iz mitohondrija ćelija divljeg soja (R-1) pekar-skog kvasca

Reakcija je započeta dodavanjem enzima mitohondrijskog porekla u test smesu sa (o) i bez 10 ug oligomicina (Δ)



Slika 44 - Reakciona kinetika oligomicina i ATP-aze iz mitohondrija ćelija *petit mutanata* (RD-1) pekarskog kvasca

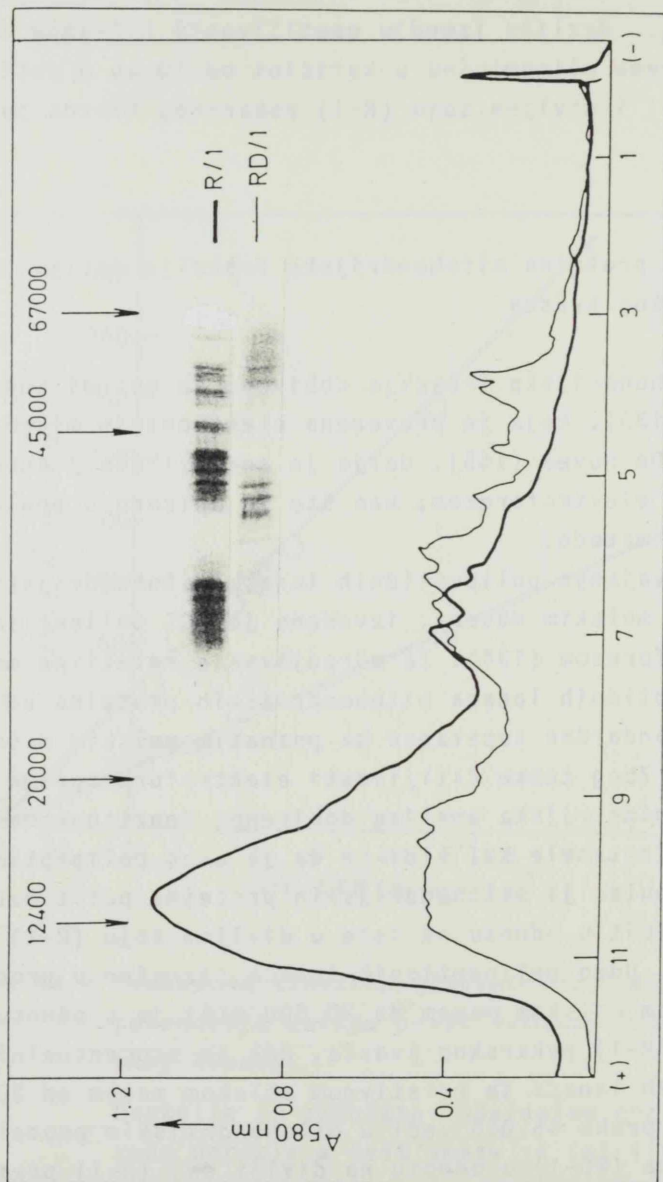
Reakcija je započeta dodavanjem enzima mitohondrijskog porekla u test smesu sa (o) ili bez 10 ug oligomicina (Δ)

jedna trećina ukupne ATP-azne aktivnosti nije osetljiva prema oligomicinu. Razlika između osetljivosti ATP-azne aktivnosti frakcije prema oligomicinu u količini od 10 μ g u petit mutantu (RD-1) i divljem soju (R-1) pekarskog kvasca je očigledna.

7.2. Sastav proteina mitohondrijske frakcije ćelija pekarskog kvasca

Mitohondrijska frakcija dobivena po metodi Cobona i saradnika (133), koja je proverena elektronskim mikroskopom i analizom De Duvea (145), dalje je analizirana jednodimenzionalnom gel elektroforezom, kao što je opisano u poglavlju - Materijal i metode.

Razdvajanje polipeptidnih lanaca mitohondrijskih proteina prema molskim masama, izvedeno je SDS poliakrilamidnom gel elektroforezom (134). Za određivanje relativne molske mase polipeptidnih lanaca mitohondrijskih proteina upotrebene su standardne supstance sa poznatim molskim masama (slika 45). Zbog teške čitljivosti elektroforetograma izvršena je planimetrijska analiza dobivenog denzitograma (tabela XXI). Iz tabele XXI vidi se da je udeo polipeptidnih lanaca u populaciji mitohondrijskih proteina petit mutanta (RD-1) različit u odnosu na iste u divljem soju (R-1) pekarskog kvasca. Udeo polipeptidnih lanaca (izražen u procentima) sa relativnom molskom masom do 20.000 niži je u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca, dok je procentualni udeo polipeptidnih lanaca sa relativnom molskom masom od 20.000 do 45.000 i preko 45.000 veći u mitohondrijskim proteinima petit mutanta (RD-1) u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca. Pored određivanja udela polipeptidnih lanaca u populaciji mitohondrijskih proteina petit mutanta (RD-1), određen je aminokiselinski sastav proteina mitohondrija (tabela XXII).



Slika 45 - Densitogram elektroforetograma mitohondrijskih proteina iz ćelija divljeg soja i petit mutanta pekarskog kvasca

Tabela XXI - Udeo pojedinih polipeptidnih lanaca u populaciji mitohondrijskih proteina petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

| Mitohondrijska | Udeo polipeptidnih lanaca sa relativnim molskim masama | | |
|---------------------|--|---------------|--------------|
| | do 20.000 | 20.000-45.000 | preko 45.000 |
| Divlji soj | 61,90 | 28,96 | 9,80 |
| Petit mutant (RD-1) | 40,09 | 42,93 | 17,45 |

Tabela XXII - Sadržaj aminokiselina koje ulaze u sastav mitohondrijske frakcije, izdvojene iz ćelija petit mutanta i divljeg soja pekarskog kvasca

| Aminokiseline | Aminokiselinski sastav izražen u (%) | |
|------------------|--------------------------------------|---------------------|
| | Divlji soj (R-1) | Petit mutant (RD-1) |
| Asp | 11,41 | 16,23 |
| Thr | 5,21 | 5,56 |
| Ser | 6,03 | 7,16 |
| Glu | 6,47 | 11,96 |
| Pro ^a | 6,83 | 2,36 |
| Gly ^a | 6,75 | 5,02 |
| Ala ^a | 6,21 | 6,40 |
| Val ^a | 9,62 | 10,21 |
| Ile ^a | 4,31 | 2,66 |
| Leu ^a | 10,43 | 5,71 |
| Tyr | 1,80 | 1,21 |
| The ^a | 9,26 | 7,39 |
| Lys | 10,07 | 10,51 |
| His | 1,62 | 1,90 |
| Arg | 5,75 | 6,02 |
| Polarnost | 46,58 | 59,34 |

a = nepolarni ostaci aminokiselina

52.21

47.79

50.42

Na osnovu dobivene aminokiselinske analize odredjen je procenat polarnosti aminokiselina koje ulaze u sastav mitohondrijskih proteina petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca. U sastav mitohondrijskih proteina ulazi oko 60% polarnih aminokiselina, dok u sastav proteina mitohondrija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca ulazi za 10% manje polarnih aminokiselina. Značajna razlika je nadjena u sledećim aminokiselinama: asparaginska, glutaminska (povećan sadržaj u petit mutantima u odnosu na divlji soj) a prolina, izoleucina i fenilalanina (smanjen sadržaj u odnosu na divlji soj).

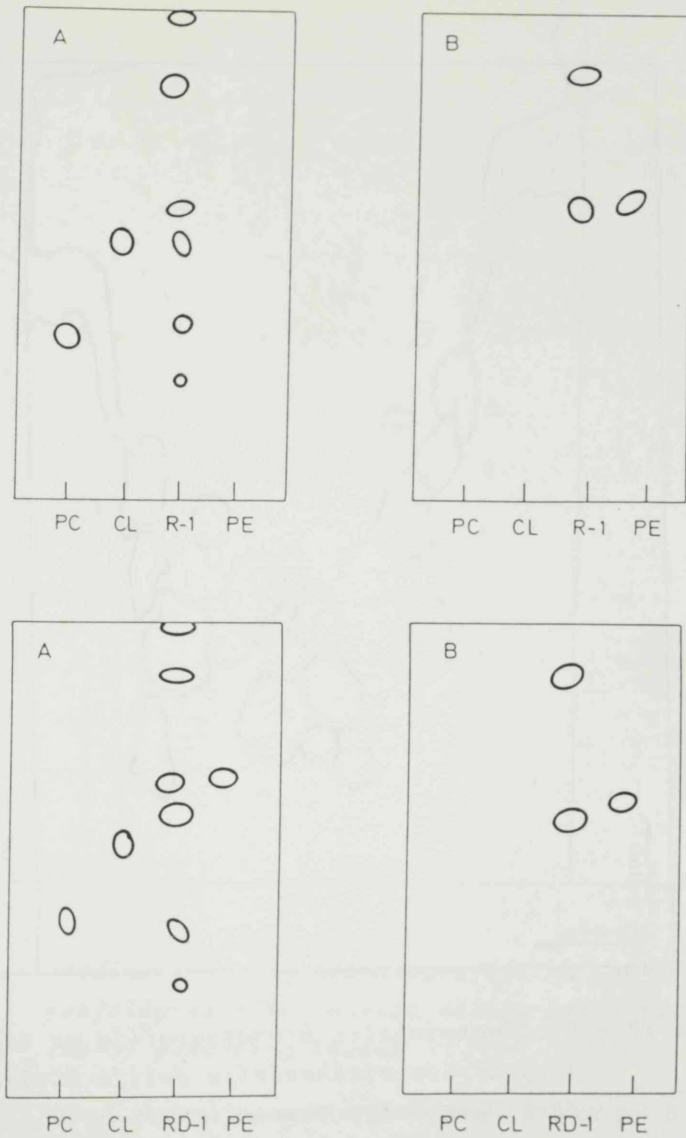
7.3. Sadržaj fosfolipida u mitohondrijama pekarskog kvasca

Mitohondrijama koje su izolovane i okarakterisane u iznetim rezultatima analiziran je i sadržaj fosfolipida.

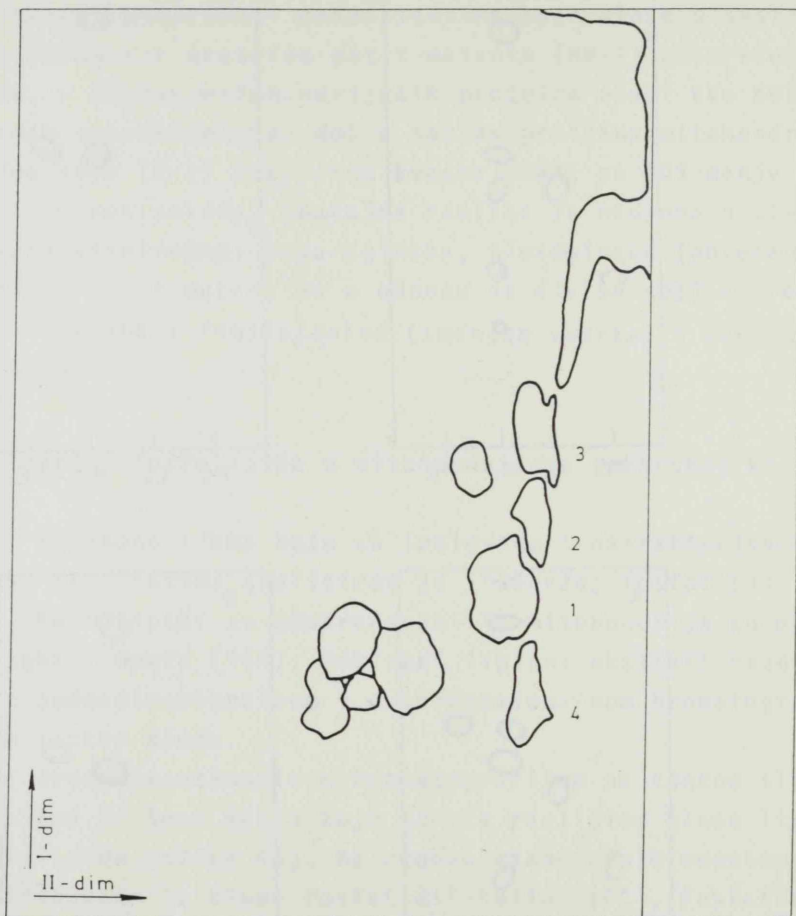
Fosfolipidi su ekstrahovani iz mitohondrija po metodi Bligha i Dyera (144). Dobiveni lipidni ekstrakt razdvojen je jednodimezionalnom i dvodimezionalnom hromatografijom na tankom sloju.

Jednodimezionalnom hromatografijom na tankom sloju razdvojeno je šest mrlja koje sadrže različite klase lipida i fosfolipida (slika 46). Na osnovu standardnih supstanci identifikovana je klasa fosfatidil-holina (PC), fosfatidil-etanolamina (PE) i cardiolipin (CL). Poredjenjem dobivenih hromatograma fosfolipida mitohondrija petit mutanta (RD-1) sa mitohondrijama ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, vidi se da nema kvalitativnih promena u fosfolipidnom sastavu mitohondrija petit mutanta (RD-1) ćelija pekarskog kvasca. Mitohondrijska frakcija ima povećan sadržaj cardiolipina (CL), oko 88,5 μg u 100 μl ekstrakta, dok mitohondrije divljeg soja sadrže oko 23,5 μg u 100 μl ekstrakta.

Dvodimezionalnom hromatografijom razdvojeno je deset mrlja koje pripadaju klasi fosfolipida, od kojih su identifikovane samo tri mrlje koje pripadaju cardiolipinu (CL),

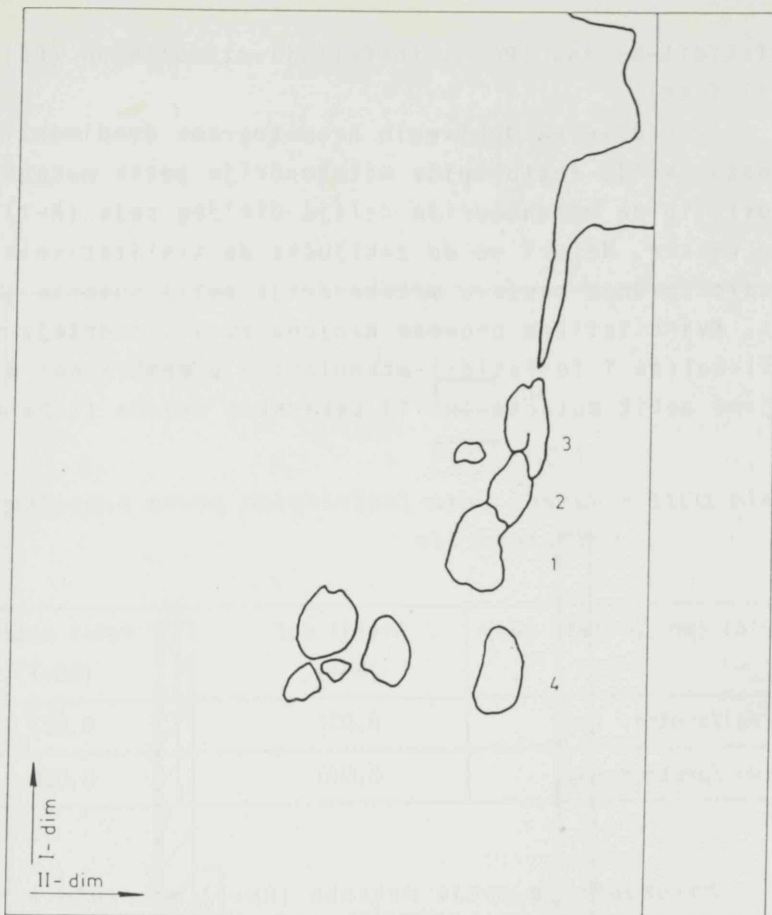


Slika 46 - Tankoslojna hromatografija fosfolipida mitohondrija petit mutanta (RD-1) i ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca: A) Detekcija fosfolipida parama joda, B) Detekcija amino-grupe u fosfolipidima ninhidrinom



Slika 47 - Dvodimenzionalna hromatografija na tankom sloju fosfolipida mitohondrija ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.

Dvodimenzionalna hromatografija na tankom sloju izvedena je na pločama Silica gel G 60 (0,25 mm) upotrebom sistema razvijača za prvu dimenziju: hloroform, zatim u istom pravcu hloroform/metanol/ 7 mol l^{-1} amonijumhidroksid (65:30:4) i druga dimenzija: hloroform/metanol/sirćetna kiselina/voda (170:25:25:4). Mrlje su izazvane parama joda. Mrlje 1, 2 i 4 pripadaju CL, PC i PE-u.



Slika 48 - Dvodimenzionalna hromatografija na tankom sloju fosfolipida mitohondrija ćelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca

100 μ l ekstrakta, naneto je na ploču Silica gel G 60 (0,25 mm); prva dimenzija je razvijena u hloroformu, a zatim u istom pravcu u sistemu razvijaača hloroform/ /metanol/7 mol l⁻¹ amonijumhidroksida (65:30:4). Druga dimenzija u sledećem sistemu razvijaača hloroform/ /metanol/sirćetna kiselina/voda (170:25:25:4). Mrlje su izazvane parama joda. Mrlje 1, 2 i 4 pripadaju CL, PC i PE-u.

fosfatidil-holinu (PC) i fosfatidil-etanolaminu (PE) (slike 47 i 48).

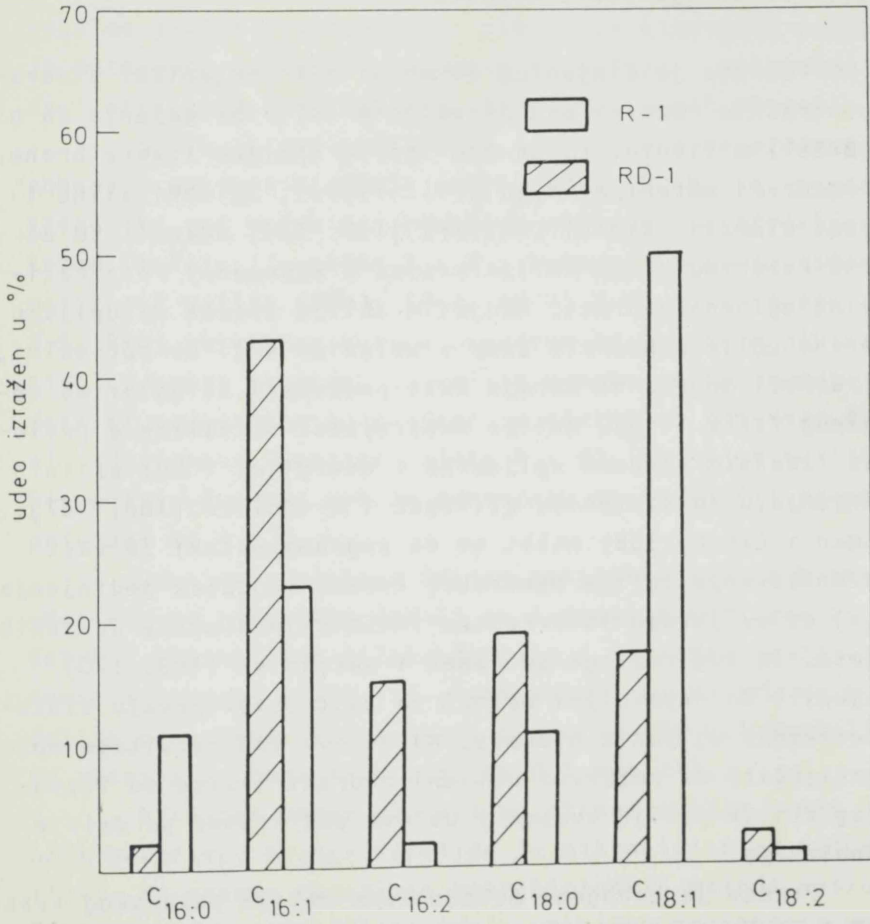
Poredjenjem dobivenih hromatograma dvodimenzionalne hromatografije fosfolipida mitohondrija petit mutanta (RD-1) i fosfolipida mitohondrija ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, dolazi se do zaključka da kvalitativnih promena u fosfolipidnom sastavu mitohondrija petit mutanta (RD-1) nema. Kvantitativne promene nadjene su i u sadržaju fosfatidil-holina i fosfatidil-etanolamina u membranama mitohondrijama petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca (tabela XXIII).

Tabela XXIII - Maseni udeo fosfolipida prema proteinu mitohondrija

| Lipidi (mg)/protein (mg) | Divlji soj (R-1) | Petit mutant (RD-1) |
|--------------------------|------------------|---------------------|
| PC(mg)/protein (mg) | 0,037 | 0,023 |
| PE(mg)/protein (mg) | 0,040 | 0,020 |

Mitohondrije petit mutanta (RD-1) pokazuju niži maseni udeo PC na mg proteina u odnosu na mitohondrije iz divljeg soja; takodje je manji maseni udeo PE, skoro dva puta u odnosu na mitohondrije divljeg soja.

Sastav masnih kiselina koje ulaze u sastav mitohondrijskih lipida ispitan je analizom gasne hromatografije (slika 49). Dobiveni rezultati pokazuju da lipidi mitohondrija ćelija petit mutanta (RD-1) sadrže 43% masne kiseline C_{16:1}, dok mitohondrije divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca svega 23%. Obrnuto je sa udelom C_{18:1}, gde lipidi mitohondrija petit ćelija (RD-1) sadrže oko 17%, a mitohondrije ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca oko 50%. Ovako različita zastupljenost masnih kiselina može imati značaj za fluidnost mitohondrijske membrane petit mutanata.



Slika 49 - Histogram masnih kiselina koje ulaze u sastav lipida mitohondrija ćelija petit mutanta (RD-1) i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca. Razdvajanje masnih kiselina izvedeno je gasnom hromatografijom

V D I S K U S I J A

1. Endogena respiracija i afinitet usvajanja glukoze ćelija petit mutanta

Poznata je činjenica da mnogi mikroorganizmi stvaraju unutrašnje rezerve pod određenim uslovima gajenja da bi se održali u životu, nakon što iscrpe spoljne izvore hrane. Kao rezervni materijal mogu biti: lipidi, aminokiseline i ugljeni hidrati. Radovi Chestera (163, 164) ukazali su da glavnu rezervnu hranu ćelija kvasca u endogenoj respiraciji čine ugljeni hidrati. Medjutim ćelije kvasca nakupljaju rezervne ugljene hidrate samo u uslovima koji su optimalni, a ti uslovi mogu a ne moraju biti podudarni sa uslovima optimalnog rasta (165). Ćelije kvasca, kada se nalaze u podlozi sa izdašnim izvorom ugljenika i energije, i bez azotnih jedinjenja, brzo sintetišu glikogen i trehalozu (166, 167). Rothman i Cabib (168) našli su da pogodni uslovi za rast i razmnožavanje ćelija pekarskog kvasca (dodatak jedinjenja azota) uslovljavaju istovremenu inhibiciju sinteze ugljenih hidrata. Iz tog razloga su Panek i saradnici (169, 170) zaključili da nepovoljni uslovi za rast uslovljavaju sintezu rezervnih ugljenih hidrata. Na osnovu tih rezultata može se zaključiti da rezervni ugljeni hidrati zavise od fiziološkog stanja ćelija kvasca i uslova pod kojima se ćelije razmnožavaju.

Praćen je endogeni metabolizam ćelija pekarskog kvasca (R-1, R-M, R-A) i petit mutanata (RD-1, RD-M, RD-A) preko njihove sposobnosti usvajanja kiseonika. Naši rezultati ukazuju da se endogeni metabolizam ćelije divljeg soja i petit mutanata značajno razlikuje (tabela I). Dobiveni rezultati prikazani u tabeli I pokazuju da ćelije petit mutanata (RD-1, RD-A, RD-M) imaju smanjenu sposobnost usvajanja

kiseonika, što može biti posledica smanjene količine rezervnih ugljenih hidrata ili posledica oštećenja respiratornog lanca u ćelijama koje su po metodi Ogura (9) bile okarakterisane kao petit mutanti. S obzirom da su ćelije petit mutanata (RD-1, RD-A, RD-M) i ćelije divljeg soja (R-1, R-A, R-M) pekarskog kvasca gajene pod istim uslovima, razlika koja se javlja u sposobnosti usvajanja kiseonika posledica je mutagenog delovanja benomila na ćelije pekarskog kvasca i oštećenja respiratornog lanca dobivenih mutanata.

Dalja istraživanja bila su usmerena na praćenje sposobnosti mutiranih ćelija (RD-1, RD-A, RD-M) za usvajanjem kiseonika pod uslovima indukcije endogene respiracije glukozom (tabela II, slike 8 i 9). Endogena brzina respiracije mutiranih ćelija (RD-1, RD-A, RD-M) i divljih sojeva (R-1, R-A, R-M) pekarskog kvasca povećava se dejstvom glukoze. Brzina endogene respiracije ćelija kvasca se nelinearno povećava sa povećanjem koncentracije glukoze i pokazuje Michaelis-Mentenovu kinetiku (slike 8 i 9). Primenom grafičke Lineweaver-Burkove metode odredjeni su kinetički parametri: prividna K_m i V_{max} .

Usvajanje glukoze ćelija pekarskog kvasca Michaelis-Mentenovom kinetikom dobili su i drugi autori kao što su Kotyk i Kleinzeller (171), Heredia i saradnici (172), Busturia i Lagunas (173) itd. Isti autori su pokazali da je afinitet ćelija pekarskog kvasca prema glukozi (K_m 0,1 mmol/l) veći od afiniteta prema fruktozi (K_m 0,5 mmol/l).

Afinitet prema glukozi od strane ćelija petit mutanata pekarskog kvasca odredjen je mikrobiološkom metodom (174). Na osnovu rezultata mikrobioloških metoda došlo se do zaključka da petit ćelije imaju smanjenu sposobnost usvajanja šećera što je verovatno i uzrok stvaranja malih kolonija (petit colonie) (43). Ovu pojavu su prvo zapazili francuski istraživači (43), pa se otuda i zadržao naziv "petit" mutanti.

Zaključak da ćelije petit mutanta imaju smanjenu sposobnost usvajanja šećera (43, 55) ima dobro slaganje sa našim rezultatima (zapažanjem). Vrednost K_m petit ćelija

(RD-1, RD-A, RD-M) prema glukozi iznosi od 0,4 do 0,66 mmol/l, što je u poredjenju sa prividnom K_m divljih sojeva (R-1, R-A, R-M) četiri puta veće. Ovo ukazuje da je isto toliko puta smanjen afinitet petit ćelija prema glukozi (tabela II i slike 8 i 9). Dobiveni rezultati za V_{max} (tabela II) pokazuju da petit mutanti, u poredjenju sa divljim sojevima, imaju četiri do jedanaest puta smanjenu efikasnost razgradnje glukoze.

Radi utvrdjivanja načina razgradnje glukoze u ćelijama petit mutanata, ispitana je brzina potrošnje kiseonika i glukoze u uslovima prividnog zasićenja ćelija glukozom. U simultanoj reakciji potrošnje kiseonika i glukoze (slike 10 A i B) merena je brzina potrošnje kiseonika i glukoze. Dobiveni rezultati pokazuju da je brzina potrošnje glukoze u ćelijama petit mutanata (RD-1) oko dva puta niža (2,35 mmol glukoze/1 min) od brzine potrošnje u ćelijama divljeg soja (R-1) (5 mmol glukoze/1 min). Dalja analiza (na mol-skoj osnovi) kiseonika i glukoze ukazuje da ćelije petit mutanata imaju anaerobni metabolizam glukoze (209).

Transport glukoze u ćelijama kvasca odvija se preko jednog transportnog sistema koji čine dve različite kontrolne komponente: komponenta sa visokim afinitetom (K_m 1,5 mmol/l glukoze) i komponenta sa niskim afinitetom (K_m 35 mmol/l glukoze) (173). Komponenta transporta glukoze sa visokim afinitetom, kojoj prema vrednosti K_m odgovaraju i naši rezultati, odgovorna je kao subjekt kataboličke represije prema Bissonu i Frankelu (175) i može uticati na prisustvo heksokinazne aktivnosti. Busturia i Lagunas (173) u svom radu zaključuju: ako je u medijumu niska koncentracija glukoze (1 mmol/l), glukoza se transportuje sa oko 70%, komponentom transportnog sistema sa visokim afinitetom; ako je koncentracija glukoze u medijumu visoka (50 mmol/l), tada se glukoza transportuje sa oko 85%, drugom komponentom koja ima niski afinitet. Naši eksperimentalni uslovi su bili u skladu sa praćenjem komponente transportnog sistema

visokog afiniteta. Kako smo već ranije istakli K_m petit mutanta je u poredjenju sa divljim sojem uvećana, odnosno afinitet smanjen četiri puta, što može biti posledica mutagenog dejstva pesticida benomila na transportne komponente glukoze ili posledica kataboličke represije koja utiče na prisustvo heksokinazne aktivnosti. Da bi se odgovorilo na postavljeno pitanje, ispitana je aktivnost i kinetički parametri enzima heksokinaze ćelija petit mutanta (tabela III i slike 11 i 12).

Kako je poznato, heksokinaza (ATP: D-heksoza 6-fosfo-transferaza EC.2.7.1.1) prvi je enzim glikolitičkog ciklusa i kao takav ima kritičnu važnost u produkciji energije i metabolizma u ćeliji. Aktivnost ovog enzima u tesnoj je vezi sa koncentracijom glukoze u medijumu i stepenom aeracije tokom rasta ćelije pekarskog kvasca (177).

Naši rezultati pokazuju da je aktivnost heksokinaze u tri ispitana mutanta (RD-1, RD-A, RD-M) povećana oko tri puta u poredjenju sa divljim sojevima (R-1, R-A, R-M) pekarskog kvasca (tabela III). Povećanu aktivnost ovog enzima u ćelijama pekarskog kvasca gajenim u anaerobnim uslovima zapazili su i drugi autori kao što su Saura i saradnici (135), Oura (177) itd. Na osnovu rezultata pomenutih autora i naših podataka o mogućem anaerobnom metabolizmu u ćelijama petit mutanta (iako su gajeni pod konstantnim dotokom vazduha), povećana aktivnost heksokinaze u ćelijama petit mutanta je samo posledica anaerobnog metabolizma. Ovo zapažanje potvrđeno je i na osnovu kinetičkih parametara i izoenzijske slike enzima heksokinaze petit mutanta (RD-1) (slike 11 i 12).

Kinetički parametri (K_m i V_{max} za glukozu) enzima heksokinaze petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca imaju iste vrednosti koje su dobivene za enzim iz divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca (K_m 0,107 mmol/l, glukoze: V_{max} 1,47 mmol $l^{-1}min^{-1}mg^{-1}$ proteina). Dobiveni rezultati imaju dobro slaganje za vrednost K_m i V_{max} sa literaturnim podacima drugih autora (179). Heksokinaza ćelija petit mutanta pokazuje istu

izoenzimsku sliku gel elektroforezom (slika 12), kao što je dobiveno i za divlji soj a što se slaže i sa rezultatima Siebenlista i Takete (178).

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da benomil nema mutageno dejstvo na transportne komponente a izmenjena slika afiniteta prema glukozu kao i povećana aktivnost enzima heksokinaze u ćelijama petit mutanata, verovatno je posledica kataboličke represije.

Drugi enzim koji ima ključnu ulogu u razgradnji glukoze, odnosno glukoze-6-fosfata u ćelijama pekarskog kvasca, je glukoza-6-fosfat dehidrogenaza. ćelije pekarskog kvasca glukozu razgradjuju uglavnom glikolitičkim putem (oko 80%), dok se manji deo glukoze (oko 20%) razgradjuje pentozno-fosfatnim putem (180). Ključni enzim pentozno-fosfatnog puta je glukoza-6-fosfat dehidrogenaza.

Angažovanost pentozno-fosfatnog puta i aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze, tesno su povezane (181). Povećana aktivnost ovog enzima u petit mutantima (RD-1, RD-A, RD-M) (tabela IV) može biti posledica većeg učešća pentozno-fosfatnog ciklusa u razgradnji glukoze u petit ćelijama pekarskog kvasca.

Analizom kinetičkih parametara (K_m i V_{max}) glukoze-6-fosfat dehidrogenaze petit ćelija pekarskog kvasca, dobiveni su rezultati koji imaju veliku sličnost sa rezultatima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze iz ćelija divljeg soja pekarskog kvasca (slika 13).

Poznata je činjenica da analiza izoenzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze omogućuje otkrivanje genske varijabilnosti u ćelijama sisara, kako su pokazali Harris i Hopkins (183), i u ćelijama biljaka, prema Goodmanu i Stuberu (182). Izvršena je analiza izoenzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze ćelija petit mutanta (RD-1) i divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca (slika 14). Naši rezultati elektroforetske analize izoenzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze ćelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca pokazuju izmenjenu izoenzimsku sliku, u odnosu na enzim iz ćelija divljeg soja. Izmenjena izoenzimska slika glukoze-6-fosfat dehidrogenaze petit mutan-

ta može biti pokazatelj genskih varijabilnosti koje su nastale pod uticajem mutagenog delovanja benomila.

2. Sastav citohroma u ćelijama petit mutanta pekarskog kvasca

Petit mutanti imaju gubitak jednog ili više gena koji su odgovorni za biogenezu i funkciju mitohondrija, usled čega imaju oštećenu sposobnost respiracije (200). Poznata je činjenica da citoplazmatični petit mutanti imaju oštećenje ili čak potpuni gubitak mitohondrijske DNA (51,61,62,53). Ovo ima za posledicu oštećenje ili gubitak biosintetske sposobnosti nekih ili svih komponenti koje se sintetišu ili zavise od ovog biosintetskog sistema (63,64). U ove komponente uključuju se i citohromi aa₃, b i c (74,75,76) kao i oligomicin osetljiva ATP-aza (74).

Nuklearni petit mutanti, sa druge strane, uključuju različite fenotipove. Mnogi od ovih mutanata su specifično deficijentni u samo jednom citohromu kao što su citohrom aa₃ ili b (52,66,67). Drugi tip nuklearnih mutanata, sa višestrukim mitohondrijskim oštećenjem (67,210,213), pripada klasi "dvostrukih" mutanata i fenotip ovih mutanata sličan je citoplazmatičnim mutantima.

Rezultati naših ispitivanja sadržaja citohroma u ćelijama petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca pokazuju da ispitani mutant (RD-1) ne sadrži citohrom aa₃ i ima smanjen sadržaj citohroma b (slike 15 i 16).

Naši prethodni rezultati pokazali su da ćelije petit mutanta imaju anaerobni metabolizam, koji može usloviti i smanjene potrebe za citohromima, što je inače poznato za ćelije pekarskog kvasca u anaerobnim uslovima (177). Da bi se utvrdila indukcija biosinteze citohroma kiseonikom, određen je sadržaj citohroma u ćelijama petit mutanta u semiaerobnim i aerobnim uslovima (slike 15 i 16, tabele V i VI).

Indukcija biosinteze citohroma aa_3 , b i c kiseonikom u ćelijama divljeg soja (R-1) dobivena je u našim eksperimentalnim uslovima, dok su ćelije petit mutanta (RD-1) povećale biosintezu samo citohroma b i c . Prema rezultatima Oure (187) količina citohroma aa_3 u ćelijama divljeg soja mnogo više zavisi od stepena aeracije ćelija nego drugi citohromi. Na osnovu ovog zaključka i naših rezultata može se zaključiti da je nedostatak citohroma aa_3 u petit ćelijama (RD-1) pekarskog kvasca, isključivo posledica mutagenog dejstva benomila, a ne posledica anaerobnog metabolizma.

Analizom izolovanih "ETP"-čestica iz ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca, pokazano je da i "ETP"-čestice ne sadrže citohrom aa_3 (slika 17). Diferencijalni spektar između redukovanog i oksidovanog oblika "ETP"-čestica pokazuje nedostatak apsorpcione trake na 605 nm što inače odgovara traci citohroma aa_3 .

Izolovane "ETP"-čestice iz ćelija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca uporedjene su sa "ETP"-česticama iz divljeg soja (R-1), preko aktivnosti enzima oksidoreduktaza (NADH-oksidade i NADH-citohrom- c -reduktaze). Dobiveni enzimski profil "ETP"-čestica (tabela VIII) petit mutanta (RD-1) u poređenju sa enzimskim profilom "ETP"-čestica divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca, pokazuje značajnu razliku. Značajno smanjena aktivnost NADH-oksidade (oko četiri puta) i NADH-citohrom- c -reduktaze (oko sedam puta), ukazuje da su pored nedostatka citohroma aa_3 izmenjene i neke druge enzimske komponente koje su tesno vezane sa elektron-transportnim lancem.

3. Elektroforetska analiza ukupnih proteina i genska varijabilnost

Elektroforetska analiza proteina ćelijskog homogenata petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca za otkrivanje genske varijabilnosti, izvedena je SDS-gel elektroforezom

po metodi O'Farrella (134). Dobiveni elektroforetogrami su skenirani i iz denzitograma-elektroforetograma planimetrijski odredjen je udeo polipeptidnih lanaca prema relativnim molskim masama sledećih opsega: do 20.000, 20.000-45.000 i preko 45.000 (tabela IX i slika 20).

Na osnovu dobivenih rezultata elektroforetske analize distribucije ukupnih proteina ćelijskog homogenta petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca u poredjenju sa proteinima divljeg soja (R-1), može se zaključiti da je nastala značajna razlika u distribuciji proteina petit ćelija (RD-1) pekarskog kvasca. Slične rezultate dobili su i drugi autori (201). Medjutim dobiveni rezultati ne ukazuju dovoljno na primarnu molekulsku leziju, nastalu pod uticajem ispitivanog mutagena.

Dobiveni rezultati su, upotpunjeni analizom aminokiselinskog sastava ukupnih proteina ćelija petit mutanata (RD-1) u poredjenju sa divljim sojem (R-1) pekarskog kvasca (tabela X). Aminokiselinska analiza pokazuje da proteini petit mutanata sadrže manji procentni udeo nepolarnih aminokiselina (41,83% kod petit mutanata i 55,40% za divlji soj), što može imati uticaja na veći udeo rastvorljivih proteina u ukupnoj populaciji proteina.

4. Sadržaj lipida kao pokazatelj promena u ćelijama mutanata

Prethodno izneti rezultati ukazuju na anaerobni metabolizam, koji je posledica oštećenja respiratornog mehanizma u ispitivanim RD-mutantima. Smanjena sposobnost usvajanja kiseonika navodi na zaključak da tim promenama može biti uslovljena i promena lipidnog sastava u mutiranim ćelijama. Sastav lipida u ćelijama pekarskog kvasca zavisi od uslova rasta (188). Glavne promene koje su otkrili Dawson i Craig (188), odnose se na stepen nezasićenosti masnih kiselina koje ulaze u sastav lipida i fosfolipida. Na stepen sadržaja nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav lipida, prema

radu Huntera i Rosea (189), značajan uticaj imaju temperatura i stepen aeracije (189, 190). Pomenuti autori pokazali su da pekarski kvasac gajen u anaerobnim uslovima "batch" sintetiše lipide koji imaju mnogo veći udeo masnih kiselina sa kratkim lancima ($C_{10}-C_{14}$), u poredjenju sa aerobnim ćelijama.

S druge strane, brojni autori (202,203,204) upotrebljavaju ćelijski sastav masnih kiselina u hemijskoj taksonomiji za identifikaciju različitih kvasaca.

Naši rezultati pokazuju da petit mutanti (RD-1) pekarskog kvasca imaju kvalitativni sastav neutralnih lipida i fosfolipida nepromenjen u odnosu na sadržaj lipida u ćelijama divljeg soja pekarskog kvasca (slike 21, 24, 25 i 26).

Kvalitativni sastav lipidnih frakcija odredjen je primenom hromatografije na tankom sloju. Klase razdvojenih lipida identifikovane su prema standardnim supstancama i dobivenih Rf-vrednosti. Statističkom analizom dobivenih Rf-vrednosti razdvojenih lipida pokazano je da nema signifikantnih razlika izmedju Rf-vrednosti klasa lipida petit mutanta (RD-1) u odnosu na Rf-vrednosti klasa lipida divljeg soja (tabele XI i XIII).

Sadržaj neutralnih lipida u petit mutantima (RD-1) prikazan je u tabeli XII. Dobiveni rezultati pokazuju da je statistički značajna razlika nastala u sadržaju diacilglicerola (336,50 ug) triacilglicerola (133,00 ug) i slobodnih masnih kiselina (463,33 ug) u ekstraktu lipida petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca u poredjenju sa sadržajem istih komponenti u lipidnom ekstraktu dobivenim iz ćelija divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca.

Dalja analiza komponenti koje su pokazale statistički značajne razlike (triacilgliceroli i masne kiseline) izvršena je gasnom hromatografijom (slike 22 i 23). Na osnovu dobivenih rezultata razdvojenih triacilglicerola prema njihovoj relativnoj molskoj masi gasnom hromatografijom i lipidni ekstrakt dobiven iz ćelija petit mutanata (RD-1), pokazao je u odnosu na lipidni ekstrakt divljeg soja (R-1)

pekarskog kvasca približno isti sadržaj triacilglicerola (C_{30} - C_{32}), smanjen sadržaj triacilglicerola (C_{34} - C_{40}) i povećan sadržaj triacilglicerola (C_{42} - C_{54}).

Na osnovu histograma udela masnih kiselina, koje ulaze u sastav lipida petit mutanta (RD-1), utvrđeno je da je udeo masnih kiselina C_{10} i C_{12} približno jednak udelu masnih kiselina divljeg soja (R-1), dok je niži udeo C_{16} , C_{18} i $C_{18:1}$, a značajno povećan udeo masnih kiselina $C_{16:1}$. Ukupni udeo nezasićenih masnih kiselina u petit mutantima (RD-1) povećan je u odnosu na divlji soj (R-1) i iznosi oko 70%, dok je udeo nezasićenih masnih kiselina u divljem soju (R-1) oko 50% (slika 23).

Povećan sadržaj nezasićenih masnih kiselina u petit ćelijama (RD-1), može imati uticaj na sastav fosfolipida, a može biti i posledica genske varijabilnosti, što je u saglasnosti sa rezultatima Soumalainena i Nurminena (191) i Cotterela i saradnika (192).

Rezultati analize sastava fosfolipida petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca prikazani su u tabelama XIII i XIV i na slikama 24, 25 i 26. Dobiveni rezultati pokazuju da petit mutanti (RD-1) sadrže iste klase fosfolipida kao i divlji soj (R-1) i da nema kvalitativnih promena (slike 24, 25 i 26, tabela XIII). Promene su samo nadjene u kvantitativnom sadržaju fosfatidil-holina i ispitivanim ekstraktima (tabela XIV). Ekstrakt iz ćelija petit mutanta (RD-1) pokazuje statistički opravdanu razliku nižeg sadržaja fosfatidil-holina u petit mutantima u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca.

Pošto fosfolipidi uglavnom imaju ulogu u gradnji ćelijskih membrana, izmenjen sadržaj fosfatidil-holina u ćelijama petit mutanta svakako ima uticaj na fluidnost i stabilnost ćelijskih membrana.

5. Sadržaj nukleinskih kiselina i morfologija ćelija i jedra pekarskog kvasca

Poznato je da ćelije pekarskog kvasca imaju teško vidljive hromozome koji se teško mogu analizirati poznatim citološkim analizama, što se upotrebljavaju kod nekih ćelija biljaka i sisara (194, 195).

Nasledne promene na nivou hromozoma obuhvataju promene strukture i broja hromozoma, a mogu se pratiti citološki ili genetički. U ovom delu rada ispitan je sadržaj nukleinskih kiselina petit mutanta (RD-1) i povezan sa veličinom i oblikom jedra i ćelije petit mutanta (tabele XV, XVI i slike 27 i 28).

Sadržaj ukupnih nukleinskih kiselina (UNK) i RNA smanjen je u ćelijama petit mutanta (za oko 20%) u odnosu na sadržaj u divljem soju (R-1) i dobivena razlika je statistički opravdana. Suprotno smanjenom sadržaju RNA u petit ćelijama (RD-1) sadržaj DNA je za 28% povećan i statistički takodje značajan (tabele XV i XVI).

Povećan sadržaj DNA je u saglasnosti sa povećanim jedrom u ćelijama petit mutanta (RD-1) (slike 27 i 28). Na osnovu elektron-mikrografa ultratankih preseka ćelija petit mutanta (RD-1) i divljeg soja kvasca (R-1), jasno se uočava morfološka razlika kako u veličini jedra tako i u veličini cele ćelije petit mutanta. Povećano jedro, kao i povećan sadržaj DNA, može biti posledica promene broja hromozoma u ćelijama petit mutanta. Slične rezultate sa ovim fungicidom ali na ćelijama pivskog kvasca dobili su Bilinski i saradnici (196).

Dovodjenjem u vezu analitičkog sadržaja RNA u ćelijama petit mutanta (RD-1) i sadržaja ribozoma na bazi elektron-mikrografa, dobiveno je dobro slaganje. Naime, petit mutanti pokazuju kako niži sadržaj RNA, tako i manji broj ribozoma, koji se jasno vide elektronskim mikroskopom.

Na osnovu dobivenih rezultata povezanosti DNA i veličine jedra, naši rezultati navode na zaključak da fungicid

benomil izaziva respiratornu deficijenciju kvasca, koja može biti posledica ne samo genskog oštećenja već i na nivou hromozoma, što je saglasno sa rezultatima i drugih autora (34, 36, 71).

Hastie (34) našao je da benomil izaziva promene u ploidiji *Aspergillus nidulans*, zatim su Kappas i saradnici (36) na istom test-organizmu zapazili istu pojavu. Konačno na ovaj zaključak navode i rezultati Gunasekarna i Taure (71), koji su pokazali da benomil izaziva mitotički krosingover u ćelijama *Saccharomyces cerevisiae* soja (D₇).

6. Morfologija, struktura i hemijski sastav mitohondrija pekarskog kvasca

Biogeneza mitohondrija leži pod zajedničkom kontrolom dva genetska sistema: mit. DNA i jed. DNA. Usled oštećenja na jednom od ta dva sistema dolazi do pojave petit mutanata. Dosad u literaturi još uvek ima oprečnih mišljenja o veličini, obliku i funkciji mitohondrija u petit mutantima.

Elektron-mikrograf ultratankih preseka ćelija divljeg soja i ispitivanog petit mutanta (slike 27, 28, 29 i 30), pokazuje morfologiju i strukturu mitohondrija u ćelijama.

Elektron-mikrograf ultratankih preseka celih ćelija divljeg soja pekarskog kvasca pokazuje tipični mitohondrijski profil (slike 27 i 28). Elektron-mikrograf ultratankih preseka celih ćelija petit mutanata ne pokazuje tipični mitohondrijski profil (slike 28 i 30). Naši rezultati ukazuju da ćelije petit mutanata nemaju zrele mitohondrije (kao ćelije divljeg soja), već su u obliku promitohondrija, što je u saglasnosti sa rezultatima i drugih autora (54, 56).

Analizom elektronskim mikroskopom Yotsuyanagi (54) pokazao je da su mitohondrije petit mutanta morfološki izmenjene u odnosu na mitohondrije divljeg soja pekarskog kvasca. Takodje je u svom radu ukazao i na morfološku

promenu mitohondrija u zavisnosti od tipa (nuklearni, citoplazmatični, dvostruki) petit mutanata. Medjutim ovi rezultati ne daju jasnu sliku kao rezultat Sagera (56), koji dokumentovano pokazuje da ćelije petit mutanta sadrže organele koje su nalik na mitohondrije i naziva ih "promitohondrijama". Promitohondrije su nadjene i kod ćelija divljih sojeva kvasca, koji su uzgajani u anaerobnim uslovima (63), ali koji nakon prodivavanja vazduha stvaraju zrele mitohondrije.

Radi boljeg upoznavanja funkcija mitohondrija u ćelijama petit mutanata, izolovane su mitohondrije iz ćelija petit mutanata. Izolovane mitohondrije iz divljeg soja prikazane na elektron-mikrografu (slika 31) predstavljaju tipičan oblik kao što su to definisali Watson i saradnici (199). Izolovane mitohondrije iz ćelija petit mutanta prikazane su elektron-mikrografom na slici 32 i pokazuju oblik promitohondrija kao što smo to dokazali i u celim ćelijama (slike 28 i 30).

Dalja karakterizacija izolovanih mitohondrija iz ćelija divljeg soja (R-1) i petit mutanata (RD-1) izvedena je preko mitohondrijskog marker enzima sukcinat dehidrogenaze po analizi De Duvea (145) (tabela XVII).

Najveći relativni specifični aktivitet sukcinat dehidrogenaze iz ćelija divljeg soja nadjen je u mitohondrijskoj frakciji (slika 33). Na osnovu ovih rezultata, enzimskim putem potvrđeno je da talog dobiven na 12000 g predstavlja mitohondrijsku frakciju.

Mitohondrijska frakcija, kao i drugi ćelijski konstituenti izolovani iz petit mutanata nisu pokazali sukcinat dehidrogenaznu aktivnost (tabela XVII, slike 36 i 37). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su ćelije petit mutanata rastale delovanjem benomila deficitantne u ovom enzimu. Naši rezultati se podudaraju sa rezultatima Nagaia i saradnika (55) koji ukazuju da je upravo nedostatak ovog enzima posledica nesposobnosti petit mutanata da se boje tetrazoliumhloridom na čemu je i zasnovana Ogurova metoda.

Na osnovu dosad dobivenih i diskutovanih rezultata jasno je da petit mutanti nastali delovanjem fungicida benomila imaju smanjen sadržaj enzima koji čine ili su tesno vezani sa respiratornim lancem. Oni imaju čak nedostatak nekih enzima kao što je citohrom oksidaza (aa_3 -citohrom) i sukcinat dehidrogenaza. Ovi su rezultati ukazali na potrebu analize kompleksa V (oligomicin osetljive ATP-aze).

Kompleks V, ili oligomicin osetljiva ATP-aza, jeste enzim koji ima ulogu da sintetizuje ATP iz ADP i P_i . Pored te uloge ATP-aza može i hidrolizovati ATP.

Poznata je činjenica da ćelije kvasca i gljiva sadrže tri tipa ATP-azne aktivnosti: mitohondrijsku ATP-azu plazma membrane i ATP-azu vakuola (193).

U cilju ispitivanja mitohondrijske ATP-aze obuhvaćeno je istraživanje i drugih ATP-aza u ćelijama RD-mutanata pekarskog kvasca.

Na osnovu distribucione analize ATP-azne aktivnosti metodom De Duvea, utvrđeno je da je distribucija ATP-azne aktivnosti u ćelijama RD-mutanata značajno različita u odnosu na distribuciju u divljem soju pekarskog kvasca (slike 38 i 39). Pored uočljive razlike u distribuciji ukupne H^+ ATP-azne aktivnosti, u ćelijama petit mutanata uočava se da je aktivnost ovog enzima oko 30% niža u odnosu na divlji soj (tabela XIX i slika 40). Slični rezultati za ćelije petit mutanata pekarskog kvasca dobiveni su i od strane drugih autora (67, 68, 186).

Michaeilis i saradnici (68) ispitivanjem nuklearnih petit mutanata pekarskog kvasca (izazvanih temperaturom), našli su da je aktivnost ukupne ATP-aze ($3690 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) 33% niža od ispitivane aktivnostu u divljem soju pekarskog kvasca ($5520 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Rezultate slične rezultatima Michaeilisa i saradnika (68) dobili su i Ebner i saradnici (67). Ovi autori su izolovali oko 12 petit mutanata nuklearnog i mutante dvostrukog tipa i pokazali da je aktivnost ukupne ATP-aze manja u odnosu na divlji soj od 15 do 75%.

Ispitivanjem ukupne ATP-azne aktivnosti citoplazma-

tičnih petit mutanata od strane Kovača i Weissove (186), na ćelijama pekarskog kvasca NCYC₇₄, takodje je utvrđena smanjena aktivnost u odnosu na divlji soj pekarskog kvasca.

Prema relativnom specifičnom aktivitetu ATP-aze analizom po De Duveu dobiveno je da je najveća razlika u distribuciji ATP-azne aktivnosti petit mutanata u poredjenju sa divljim sojem nastala u mikrozomskoj i mitohondrijskoj frakciji (slike 38, 39 i tabela XX). Kinetika enzima iz obe izolovane frakcije iz ćelija petit mutanata i divljeg soja ponašaju se po Michaelis-Mentenovoj kinetici. Primenom Lineweaver-Burkovog dijagrama određeni su kinetički parametri ATP-aze prema supstratu ATP-u (K_m i V_{max}) (tabela XX, slike 41, 42, 43). Dobiveni kinetički parametri za ATP-azu (K_m i V_{max}) iz ispitivanih frakcija ukazuju da ćelije petit mutanata kao i ćelije divljeg soja prema rezultatima Lichko i Okorokova (193) imaju dva tipa enzima - mitohondrijski i enzim vakuola. Mitohondrijska ATP-aza divljeg soja ne pokazuje razliku u vrednosti za K_m (tabela XX), već ima značajno promenjenu maksimalnu brzinu (V_{max_R} 0,136; $V_{max_{RD}}$ 0,059 A/min mg).

ATP-aza vakuola petit mutanata u poredjenju sa ATP-azom vakuola divljeg soja pokazuje pored promene V_{max} (što je zapaženo i kod mitohondrijske ATP-aze), i promenu vrednosti K_m (K_{m_R} 0,77; $K_{m_{RD}}$ 1,17 mmol/l).

Identifikacija mitohondrijske ATP-aze ili oligomicin osetljive ATP-aze izvedena je inhibicijom sa oligomicinom. Inhibitorna slika oligomicin ATP-aze petit mutanata je nepromenjena u odnosu na enzim iz divljeg soja (slike 43 i 44).

Aktivnost oligomicin osetljive ATP-aze petit mutanata u odnosu na divlji soj značajno je niža (oko 50%) što je u slaglasnosti i sa rezultatima drugih autora kao što su Schatza i Saltzgabera (63) i Kovača i Hrušovske (60), Michaelis i saradnici (68).

Michaelis i saradnici (68) ispitivanjem oligomicin osetljive ATP-aze u nuklearnim petit mutantima pekarskog kvasca našli su da je aktivnost ovog enzima (2480 nmol min⁻¹ mg⁻¹)

42% niža u odnosu na aktivnost iz divljeg soja pekarskog kvasca, koja iznosi $4290 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Ispitivanjem ATP-aze u citoplazmatičnim petit mutantima pekarskog kvasca Schatz i Saltzgaber (63), našli su da ovi petit mutanti ne sadrže oligomicin osetljivu ATP-azu. Slično prethodnim rezultatima da petit mutanti imaju smanjenu aktivnost oligomicin osetljive ATP-aze ili čak potpuno odsustvo, Kovač i Hrušovska(60) izolovali su mutante deficijentnim u oksidativnoj fosforilaciji, koji takodje imaju smanjenu oligomicin osetljivu ATP-azu 63% u odnosu na divlji soj pekarskog kvasca.

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je zbog smanjene aktivnosti oligomicin osetljive ATP-aze u ćelijama petit mutanta smanjena oksidativna fosforilacija.

7. Sastav mitohondrijske membrane pekarskog kvasca kod ispitivanih ćelija

Glavni deo mitohondrija (računato na suhu masu), čine proteini i lipidi odnosno fosfolipidi. Proteine čine uglavnom enzimi, citohromi, nosači ili transporteri jona i metabolita i nedovoljno okarakterisani strukturni proteini (208, 161). Jedan deo proteina je solubilisan, dok je drugi deo proteina tesno vezan za membranu i teško je rastvorljiv, sa velikim procentom hidrofobnih aminokiselina (114,115,116).

Sastavni deo mitohondrija čine lipidi i to fosfolipidi. Od fosfolipida značajno mesto zauzimaju fosfatidil-holin (123), fosfatidil-etanolamin (125) i kardiolipin (131).

Karakteristično je da u sastav fosfolipida mitohondrijske membrane ulazi velik procenat nezasićenih masnih kiselina i nezasićenih masnih kiselina sa velikim brojem C atoma (207). Karakter masnih kiselina varira od organa do organa i zavisi od vrste mikroorganizama i načina ishrane (208). Fluidnost membrane, a time i mnoge funkcije mitohondrija zavise od tipa masnih kiselina koje ulaze u sastav

njihovih fosfolipida.

Leaster (207) našao je da kardiolipin ulazi u sastav ukupnih fosfolipida mitohondrije kvasca sa oko 10% i da je direktno proporcionalan sadržaju citohroma.

Prema rezultatima Lestera trebalo bi očekivati da petit mutanti koji imaju smanjen sadržaj citohroma imaju i smanjen procenat kardiolipina. Medjutim, naši rezultati sa ćelijama petit mutanata (RD-1) pekarskog kvasca, koji su deficijentni u citohromu aa_3 , pokazuju čak veći sadržaj kardiolipina u poredjenju sa ćelijama divljeg soja (R-1). Naši rezultati su saglasni rezultatima drugih autora (128-130) kojima se tvrdi da kardiolipin utiče na aktivnost citohrom oksidaze, ali tačan podatak o njegovoj funkciji i lokaciji još nije poznat. Ima pokazatelja da je kardiolipin vezan za podjedinicu I citohrom oksidaze (127), koja je inače kodirana mitohondrijskom DNA (95,96,97), te je otuda povećan sadržaj kardiolipina možda posledica nastale mutacije na nivou citohrom oksidaze.

S druge strane podaci prema Ernsteru i saradnicima (127) ukazuju da je kardiolipin sastavni deo ATP-aznog sintetskog kompleksa i da "drška" ATP-aze sadrži CL. Naši rezultati pokazuju da je aktivnost ATP-aze kako ukupna tako i specifična, smanjena u mitohondrijama petit ćelija (RD-1), što navodi na zaključak da povećanje kardiolipina ima negativan uticaj na enzime u čiji sastav ulaze (slike 38,39, 43,44).

U lipidni sastav mitohondrija pored kardiolipina ulaze fosfatidil-holin i fosfatidil-etanolamin, koji takodje imaju značajnu ulogu u biološkoj aktivnosti mitohondrija i njihove membrane. Naši rezultati ukazuju da je u ćelijama petit mutanta (RD-1) manji sadržaj ovih fosfolipida (PC i PE) u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca (tabela XXII i slike 46, 47 i 48). Dalja analiza sastava fosfolipida mitohondrija petit ćelija (RD-1) izvedena je ispitivanjem sastava masnih kiselina koje ulaze u gradju fosfolipida (slika 49). Dobiveni rezultati pokazuju da lipidi mitohondrija

ćelija petit mutanta (RD-1) sadrže 43% palmitooleinske kiseline $C_{16:1}$, dok mitohondrije divljeg soja (R-1) svega 15%. Obrnut udeo dobija se za oleinsku kiselinu $C_{18:1}$. Sadržaj masnih kiselina u mitohondrijama petit mutanta (RD-1) značajno je izmenjen u poredjenju sa ćelijama divljeg soja (R-1), što može uticati na biološku aktivnost mitohondrijske membrane petit mutanta.

Iz prethodno iznetih rezultata vidi se da u petit mutantima (RD-1) nedostaje citohrom oksidaza (slike 15, 16, 17), sukcinat dehidrogenaza (tabela XVIII) i smanjena aktivnost ATP-aze (slike 43 i 44), odnosno enzimi koji su sastavni deo unutrašnje mitohondrijske membrane. Iz tog razloga ispitan je sastav proteina koji čine mitohondrijsku membranu petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca. Membrana je solubilizovana SDS-om kao što je to opisano u delu - Materijal i metode a proteini su razdvojeni poliakrilamidnom gel elektroforezom (slika 45). Na osnovu denzitograma elektroforetograma može se zaključiti da populacija proteina koji ulaze u sastav mitohondrijske membrane petit mutanta (RD-1) ima značajno izmenjenu zastupljenost sadržaja polipeptidnih lanaca sa relativnom molekulskom masom do 20.000 (smanjen), dok je povećana zastupljenost proteina sa Mr 20.000-45.000 i preko 45.000 (tabela XXI).

Ako se sad dovedu u vezu polipeptidni lanci citohrom oksidaze čije molekulske mase iznose 14.000 i 21.000 (podjedinica I, II) kodirane od strane jedarne DNA, može se eventualno zaključiti da je nedostatak tih polipeptidnih lanaca uticao da je u ukupnoj populaciji mitohondrijskih proteina sadržaj polipeptidnih lanaca ispod 20.000 manji u petit mutantima (RD-1) pekarskog kvasca. S druge strane analizom sadržaja hidrofobnih aminokiselina, koje su uglavnom u proteinima membrane, pokazuje da mitohondrijski proteini petit mutanata imaju smanjen udeo hidrofobnih aminokiselina (tabela XXII).

Sve ovo navodi na zaključak da je proteinski sastav mitohondrija petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca izmenjen,

što je posledica mutacije izazvane benomilom.

Izneti rezultati doprinose razjašnjavanju kontradiktornih rezultata o mutagenom delovanju fungicida benomil. Oni su saglasni sa rezultatima Kappasa (27), Dassenoja i Meyera (32), Hastiea (34), Evansa i Mitchella (39) i Gunasekarena i Taura (42, 71), koji upotrebom drugih mikrobnih test-sistema tvrde da fungicid benomil ima mutageno dejstvo.

Kappas i saradnici (27) ispitivanjem indukcije povratnih mutacija u test-sistemima *Salmonelle typhimurium* (TA 1535) i *Escheriche coli* WP-2, nastalim supstitucijom baza, pokazali su da fungicid benomil ima mutageno dejstvo. Slični rezultati dobiveni su i od strane Dassena i Meyera (32) ispitivanjem mutacije unapred na *Fusarium oxysporum*. Ispitivanjem u test-sistemu na nivou hromozoma, na plesni *Aspergillus nidulans*, Hastie (34) i Kappas i saradnici (36) dokazali su da benomil izaziva hromozomsko neodeljivanje. Gunasekaren i Tauro (71, 42) na ćelijama pekarskog kvasca dobili su mutante tipa petit pod dejstvom fungicida benomila.

Naši rezultati ukazuju da se kao pogodan test-sistem za utvrđivanje mutagenog dejstva hemijskih jedinjenja mogu upotrebiti i ćelije petit mutanata pekarskog kvasca. Značajno je napomenuti da petit mutanti okarakterisani Ogurovom metodom nisu dovoljni kao pokazatelj, već treba kao brzi selektivni test upotrebiti spektar citohroma i aktivnost enzima sukcinat dehidrogenaze.

VI ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih rezultata i iznete diskusije došli smo do sledećih zaključaka:

1. Fungicid benomil izaziva mutaciju u ćelijama pekarskog kvasca, tipa petit mutanata.
2. Petit mutanti (RD-1, RD-A, RD-M) pekarskog kvasca imaju pet do šest puta smanjenu endogenu respiraciju u odnosu na ćelije svojih divljih sojeva (R-1, R-A, R-M) pekarskog kvasca. Takodje imaju tri do pet puta niži afinitet prema glukozu dok je maksimalna brzina smanjena četiri do jedanaest puta.
3. Ćelije petit mutanta (RD-1, RD-A, RD-M) imaju povećanu aktivnost enzima heksokinaze (dva do četiri puta) i glukoze-6-fosfat dehidrogenaze (dva do šest puta) u odnosu na ćelije divljeg soja (R-1, R-A, R-M) pekarskog kvasca. Povećana aktivnost heksokinaze ukazuje na kataboličnu represiju u petit mutantima, a povećana aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze ukazuje na veće učešće pentozno-fosfatnog puta u razgradnji glukoze u ćelijama petit mutanta.
4. Ćelije petit mutanta (RD-1) imaju manji sadržaj citohroma b ($3,69 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$), citohroma c ($4,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$) u odnosu na ćelije divljeg soja (b = $5,44 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, c = $6,52 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Sadržaj citohroma u petit mutantima zavisi od stepena aeracije, kod citohroma c i b. Petit mutanti nemaju citohrom aa₃ i ne može se indukovati povećanom respiracijom.
5. Ćelije petit mutanta pokazuju anaerobni metabolizam, što se odražava i na smanjenje aktivnosti NADH-oksidaze i NADH-citohrom-c-reduktaze u odnosu na ćelije divljeg soja pekarskog kvasca.

6. Kvalitativni lipidni sastav ćelija petit mutanta (RD-1) u odnosu na ćelije divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca nije izmenjen. Razlike nastaju u kvantitativnom sadržaju sn-triacilglicerola, fosfatidil-holina kao i u različitom udelu nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav ispitivanih lipida. Petit mutanti pokazuju veći sadržaj sn-triacilglicerola (463,33 ug računato na holesterol) u poredjenju sa ćelijama divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca (144,33 ug). Procentni udeo triacilglicerola u čiji sastav ulaze masne kiseline dužih lanaca više su zastupljeni u ćelijama petit mutanata u odnosu na ćelije divljeg soja pekarskog kvasca. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina u ćelijama petit mutanta iznosi 70%, a kod ćelija divljeg soja 50% računato na ukupne masne kiseline u ćelijama.
7. Ukupni proteini kao i proteini mitohondrijske frakcije petit mutanta (RD-1) u odnosu na ćelije divljeg soja (R-1) pekarskog kvasca pokazuju različit udeo pojedinih populacija proteina u populaciji ukupnih i mitohondrijskih proteina, što je posledica mutagenog dejstva fungicida benomila.
8. Sadržaj ukupnih nukleinskih kiselina i RNA oko 30% je niži u petit mutantima (RD-1) u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca, dok je sadržaj DNA povećan. ćelije petit mutanta (RD-1) u odnosu na ćelije divljeg soja (R-1) imaju morfološki izmenjen oblik; flašastog su izgleda, sa uvećanim jedrom i smanjenim brojem ribozoma.
9. Mitohondrije petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca imaju izmenjen oblik, strukturu i funkciju. Mitohondrije petit mutanta imaju izgled promitohondrija. Lipidni i proteinski sastav mitohondrija petit mutanta (RD-1) u odnosu na divlji soj (R-1) pekarskog kvasca značajno je izmenjen.
10. Mitohondrije petit mutanta (RD-1) pekarskog kvasca imaju smanjenu aktivnost enzima ATP-aze, kako ukupne ($0,084 \text{ A min}^{-1}$) tako i specifične oko 50% ($0,048 \text{ A min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) u odnosu na divlji soj ($0,732 \text{ A min}^{-1}$ i $0,306 \text{ A min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

11. Mitochondrije petit mutanta imaju ATP-azu smanjene osetljivosti prema oligomicinu. ATP-azu iz divljeg soja oligomicin inhibira sa 70%, dok petit mutanti sa 50%.
12. Mitochondrije petit mutanta (RD-1) ne pokazuju sukcinat-dehidrogenaznu aktivnost.

VI CONCLUSION

According to the experimentally obtained results as well as the presented discussion we have deduced the following conclusions:

1. Fungicide benomyl caused the mutation of baker's yeast cells of petit mutant type.
2. Petit mutants (RD-1, RD-A, RD-M) of baker's yeast, proved to have decreased endogenic respiration even five to six times in relation to the cells of wild strain baker's yeast cells (R-1, R-A, R-M). Affinity to glucose is also smaller for three to five times, while the maximum velocity is reduced from four to eleven times.
3. Petit mutant cells (RD-1, RD-A, RD-M) have indicated an increased content of hexokinase enzyme (from two to four times) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (from two to six times) in relation to baker's yeast wild strain cells (R-1, R-A, R-M). An increased content of hexokinase indicates the presence of catabolitic repression in petit mutants, while the increased content of glucose-6-phosphate dehydrogenase an increased participation of pentozono-phosphatic pathway of glucose degradation in petit mutant cells.
4. Petit mutant RD-1 cells have smaller content of cytochromes b ($3,69 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$), and cytochromes c ($4,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$) in relation to wild strain cells (c = $5,44 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$) in relation to wild strain cells (b = $6,52 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Cytochrome content in petit mutants depends on the aeration degree for c and b cytochromes. Petit mutants are without cytochrome aa₃ and it couldn't be induced by an increased respiration.
5. Petit mutant cells indicate anaerobic metabolism reflected also by decreased activities of NADH-oxidase and NADH-cytochrom-c-reductase in relation to wild strain cells.

6. Qualitative lipid composition of petit mutants (RD-1) in relation to baker's yeast wild strain cells (R-1) proved to remain unchanged. Differences appear in quantitative content of cholines and variable share of non-saturated fatty acids, which are the components of investigated lipids. Petit mutants indicate higher content of sn-triacyl glicerols (463,33 μg calculates on cholesterol) if compared to the baker's yeast wild strain cells (144,33 μg). Percentage share of triacyl glicerols with long-chain fatty acids as the part of their composition, proved to be higher in petit mutant cells than in baker's yeast wild strain ones. Non-saturated fatty acids content in petit mutant cells amounts 70% while at wild strain cells 50% calculated on total fatty acids.
7. Total proteins as well as the ones of mitochondrial fraction of petit mutants (RD-1) in relation to baker's yeast wild strain cells (R-1) indicate different share of particular protein population in the population of total and mitochondrial proteins as the result of mutagenic effects of fungicide benomyl.
8. The content of total nucleic acids and RNA is smaller for about 30% in petit mutants (RD-1) in relation to baker's yeast wild strain cells (R-1) while the content on DNA proved to be higher. Petit mutant cells (RD-1) in relation to wild strain cells (R-1) have the morphologically changed shape and the increased nucleus.
9. Mitochondria of petit mutants (RD-1) of baker's yeast indicate the changed shape, structure and function. Mitochondria of petit mutants have the appearance of promitochondria. Lipid and protein composition of petit mutant mitochondria (RD-1) in relation to baker's yeast wild strain (R-1) is markedly changed.
10. Mitochondria of petit mutants (RD-1) of baker's yeast have a decreased activity of ATP enzyme both total ($0,084 \text{ A min}^{-1}$) and specific ($0,048 \text{ A min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) in relation to the wild strain ($0,732 \text{ A min}^{-1}$ and $0,306 \text{ A min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

11. Mitochondria of petit mutants have ATP of decreased sensitivity to oligomycin. ATP from wild strains proved to be inhibited by oligomycin with 70% while at petit mutants with 50%.
12. Mitochondria of petit mutants (RD-1) have no indication of succinodehydrogenase.

L I T E R A T U R A

1. Ehrenberg, L., Brookes, P., Druckrey, H., Lagerlörf, B., Litwin, J., and Williams, G. (1973), In: "Evaluation of genetic risk of environmental chemicals (C. Ramel, ed.) Ambio, Special Report No 3, Royal Swedish Acad. Sci., pp.15*
2. Vitorović, S. (1987) Pesticidi, 2, 59
3. Ephrussi, B. (1956) Naturwissenschaften, 43, 505
4. Raut, C., and Simpson, W. (1955) Arch. Biochem. Biophys. 57, 218
5. Sherman, F. (1957) Exptl. Cell Research 11, 659
6. Nagai, S. (1959) Science 130, 1188
7. Moat, A., Peterson, N., and Srb, A. (1959) J. Bacteriol. 77, 673
8. Vrbaški, Lj., Hauk, M., Nadj, Dj., and Jančić, S. (1982) Izveštaj o radu za 1981. o. SIZ za naučni rad, SAP Vojvodina
9. Ogur, M., St. Johon, R., and Nagai, S. (1957) Science 125, 1612
10. Edgington, V., Khew, L., and Barron, L. (1971) Phytopathology, 61, 42
11. Bollen, J. (1972) Neth. J. Plant. Path. 78, 55
12. Seiler, J. (1975) Mut. Research. 32, 151
13. Corbett, J. (1974) In: "The Biochemical Mode of Action of Pesticides", Academic Press, London, New York, pp. 125
14. Clemons, G., and Sisler, D. (1969) Phytopathology, 59, 705
15. Hammerschlag, R., and Sisler, D. (1973), Pesticide Biochem. Physiol. 3, 42
16. Baude, J., Gardiner, J., and Han, J. (1973) J. Agr. Food Chem. 21, 1084
17. Hammerschlag, R., and Sisler, D. (1972) Pesticide Biochem. Physiol. 2, 123
18. Solel, Z., and Edgington, V. (1973) Phytopathology 63, 505
19. Sigel, M., and Zabbia, J. (1972) Phytopathology 62, 630
20. Peterson, G., and Edgington, V. (1969) J. Agric. Food Chem. 17, 893
21. Gardner, J., Kirkland, J., Klopping, H. and Sherman, H. (1974) J. Agr. Food Chem., 22, 419
22. Gardner, J., Brantley, K., and Sherman, J. (1968) J. Agr. Food Chem. 16, 1050

*Literatura je prezentirana po pravilima časopisa The Journal of Biological Chemistry.

23. White, E., Bose, E., Ogawa, J., Manji, B., and Kilgore, W. (1973) *J. Agric. Food Chem.* 21, 616
24. Ogawa, A., Bose, E., Manji, E., White, E., and Kilgore, W. (1971) *Phytopathology*, 70, 905
25. Rashid, A., and Ercegovich, D. (1976) *Sci. Agric.* 23, 7
26. Donovan, M., and Krahn, F. (1981), HLR No 434-81. Report dd. 10/14/77, submitted to WHO by Du Pont
27. Kappas, L., Green, B., Bridges, B., Rogers, A., and Muriel, W. (1976) *Mutation Res.*, 40, 379
28. Ficsor, G., Bordas, S., and Stewart, J. (1978) *Mutation Res.*, 51, 151
29. Ames, B. (1971), In: "Chemical mutagens: Principles and methods for their detection" (A. Hollaender, ed.) Vol 1, Plenum Pres, N.Y. pp. 267
30. Shirasu, (1983) Pesticide residues in food, WHO, Geneva 5-14 December, 1983
31. Green, L., and Muriel, W. (1976), *Mutation Res.*, 38, 30
32. Dassenoy, B., and Meyer, J. (1973), *Mutation Res.*, 21, 119
33. De Bertholdi, M., and Griselli, M. (1980), *Mutation Res.* 303
34. Hastie, C. (1970), *Nature*, 226, 771
35. Bignami, M., Aulicino, F., Velcich, A., Carere, A., and Morpurgo, G. (1977), *Mutation Res.* 46, 395
36. Kappas, A., Gergopoulos, E., and Hastie, A. (1971) *J. Gen. Microbiol.* 67, 371
37. Fitzpatrick, K., and Krahan, D. (1980), HLR, No. 438-80. Report dd. 7/15/83, submitted to Who by Du Pont.
38. Gupta, A., and Legator, S. (1975) In Proc. Symp. Mutagenicity Carcinogenicity and Teratogenicity of Chemicals, Dept. of Atomic Energy, India, pp. 95-103
39. Evans, L., and Mitchell, D. (1980) SRI International, August, 1980, Report submitted to WHO by Du Pont
40. Tong, C. (1981), HLO, 741-81. Report by the Naylor Dana Institute dd. 10/20/81 submitted to WHO by Du Pont
41. Siebert, D., Zimmerman, K., and Lemperle, E. (1970) *Mutation Res.* 10, 533
42. Gunasekaran, P., and Tauro, P. (1983) *Life Sci. Adv.*, 2, 75
43. Slonimski, P. (1949), *Ann. Inst. Pasteur* 77, 774
44. Ephrussi, B., Hottinguer, H., and Chimenes, M. (1949) *Ann. Inst. Paster* 76, 351
45. Yanagishima, N. (1956) *J. Inst. Polytech. Ser. D*, 7, 131
46. Lindergen, C. (1956), *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg. Ser. physiol.* 26, 253

47. Ogur, M. and John, St. R. (1956) *J. Bacteriol.* 72, 500
48. Kadenbach, B. (1971) In: "Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts", (Boardman, W., Linnane, M., Smillie, M. ed) North-Holland, pp. 360
49. Wild, G. and Hinshelwood, C. (1956) *Proc. Roy. Soc. (London)* 145, 14
50. Wright, E. and Lederberg, J. (1956) *Proc. Natl. Acad. U.S.* 43, 919
51. Mounolou, J., Jakob, H. and Slonimski (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 218
52. Sherman, F. and Slonimski, P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 90, 1
53. Borst, P. (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41, 332
54. Yotsuyanagi, Y. (1962) *J. Ultrastuc. Res.* 7, 141
55. Nagai, S., Yanagishima, N., and Nagai, H. (1961) *Bact. Rev.* 25, 404
56. Sager, R. (1972) In: "Cytoplasmic genes and organelles" Academic Press, New York and London pp. 228
57. Slonimski, P., and Hirsch, H. (1952) *Compt. rend.* 235, 741
58. Raut, C. (1953). *Exptl. Cell Research* 4, 295
59. Yčas, M. and Starr, J. (1953) *J. Bacteriol.* 65, 83
60. Kovač, L., and Hrušovska, E. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 153, 4
61. Goldging, E., Grossman, L., Kinipinkk, D., Greyer, D. and Maramur, J. (1970), *J. Mol. Biol.* 52, 323
62. Nagley, P., and Linnen, A. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 39, 989
63. Schatz, G., and Saltzgaber, J. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 996
64. Kužela, S., and Grečná, E. (1969) *Experientia*, 25, 776
65. Chen, S., Ephrussi, B. and Hotimguer, H. (1950) *Heredity* 4, 337
66. Reilly, C., and Sherman, F. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 95, 640
67. Ebner, E., Mennucci, L., and Schatz, G. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5360
68. Michaeilis, G., Mannhaupt, G., Pratje, E., Fischer, E., Naggert, J., and Schweizer, E. (1982) *Cold Spring Harbor Monogr. Ser. Vol* 12, pp. 311
69. Hughes, E., Loyd, D., and Brightwell, R. (1970) In: "Organization and control in prokaryotic cells". (Charles, D., and Knight, B. ed.) Cambridge Univ. Press. pp. 295
70. Linnane, W., Haslam, M., Lukins, B., and Nagey, P. (1972) *Annu. Rev. Microbiol.* 26, 163

71. Gunasekaran, P., and Taura, P. (1982) *Current Science*, 51,469
72. Shapiro, L., Grossman, L., Marmur, J., and Kleinschmidt, K. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 907
73. Schatz, G., and Mason, L. (1974) *Annu. Rev. Biochem.* 43, 51
74. Rubin, M., and Tzagoloff, A. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248,4269
75. Lin, L., Clejan, L., and Beattie, S. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87,171
76. Tzagoloff, A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8236
77. Demmer, W. (1980). Dissertation Erlangen, 1980
78. Ephrussi, B., and Slonimski, P. (1950), *Biochim. Biophys. Acta*, 6, 256
79. Rouslin. W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 685
80. Sanders, K., Briquet, M., and Foury, F. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9090
81. Ziegler, D., and Rieske, J. (1967) *Meth. Enzymol.* 10, 231
82. Rieske, J. *Meth. Enzymol.* 10, 239
83. Ragan, C. (1976), *Biochemical J.* 154, 295
84. Knoweles. F., and Penefsky, H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6624
85. McEwen, J., Cumsy, M., Ko, C., Power, S., and Poyton, R. (1984) *J. Cell. Biochem.* 24, 229
86. Pittman, D., Webb, M., Roshanmanesh, A., and Coker, E. (1960) *Genetics* 45, 1023
87. Neupert, W., and Schatz, G. (1981) *Trends Biochem. Sci.* 6, 1
88. Poyton, R., Bellus, G., and Kermer, A. (1982) In: "Membranss and Transport" (Martonesi, A. ed.) Vol 1, Plenum Press, New York, pp. 237
89. Schatz, G., and Butow, A. (1983), *Cell* 32, 316
90. Poyton, R. (1983) In: "Spatial organization of eucaryotic cells" (Miclntosh, J. ed.) Alan R. Liss, Inc., New York, pp.1
91. Kaput, J., Goetz, S., and Blobel, S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 15054
92. Naguta, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Natio, A., and Kaziro, Y. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 612
93. Michaelis, S., and Besckwith, J. (1982) *Annu Revv. Microbiol.* 36,435
94. Inouye, S., Sobberson, T., Franceschine, K., Nakamura, K., Itakura, K., and Inouye, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3438
95. Bonitz, G., Corouzzi, G., Thalenfeld, E., and Tzagoloff, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 25, 11927
96. Coruzzi, G., and Tzagoloff, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,9324
97. Thalenfeld, B., and Tzagoloff, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6173

98. Poyton, O., and Schatz, G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 752
99. George-Nascimento, C., and Poyton, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9363
100. Gregor, I., and Tsugiata, A. (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 13081
101. Bende, C. (1898) *Verh. Physiol. Ges. Berlin* 376-383
102. Keilin, D. (1925) *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)* 98, 312
103. Warburg, O., and Negelein, E. (1929) *Biochem. Z.* 214, 64
104. Krebs, A., and Johnson, A. (1937) *Enzymologia* 4, 168
105. Hageboom, H., Schneider, C., and Palade, E. (1948) *J. Biol. Chem.* 172, 619
106. Palade, E. (1953) *J. Hystochem. Cytochem.* 1, 188
107. Frenandez-Moran, H. (1962) *Circulation* 26, 1039
108. Racker, E., Tyler, D., Estabrook, W., Conover, E., Parson, F., and Chance, B. (1965) In: "Oxidases and related redox systems" (King, T., Mason, H., and Morrison, M. eds.) John Wiley and Sons, New York, pp. 1077
109. Mitchell, P. (1961) *Nature (London)* 191, 423
110. Mitchell, P. (1966) In: "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation", Glyn Research, Bodmin, Cornwall, U.K.
111. Mitchell, P. (1968) In: "Chemiosmotic coupling and energy transduction", Glynn Research, Bodmin, Cornwall, U.K.
112. Mitchell, P. (1976) *J. Theoret. Biol.* 62, 327
113. Michell, P. (1979) *Science* 206, 1148
114. Shapiro, L., Vinuela, E., and Maizel, V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815
115. Schatz, G., Halsbrunner, E., and Tuppy, H. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 127
116. Tzagoloff. A. (1982) *Mitochondria*, Plenum Press, New York and London
117. Nicholls, G. (1982) *Bioenergetics*, Academic Press, London
118. Hatefy, Y., Galante, M., Stiggall, L., and Ragan, I. (1979) *Methods Enzymol.* 56, 577
119. Capaldi, A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 694, 291
120. Ruitinbek, (1987). 18 th FEBS - 18th, Ljubljana, Abstr. Commun. pp. 186
121. Grivell, L. (1983) *Spektrum d. Wissensch.* 5, 72
122. Cullis, R., de Kruijff. B., Hope, J., Najar, R., Rietveld, A., and Verkleij, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 600, 625
123. Krebs, R., Hauser, H., and Carafol, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5308

124. Marinetti, V., Senior, E., Love, R., and Broadhurst, I. (1976) *Chem. Phys. Lipids* 17, 353
125. Nilsson, S., and Dallner, G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464, 453
126. Gantar, M. (1980). Doktorski rad, Univerzitet u Novom Sadu
127. Ernster, L., Sandri, G., Hundal, T., Carlsson, C., and Noredebrand, K. (1977) In: "Structure and function of energy-transducing membrans (van Dam, K. and van Gelder, F. eds) Elsevier, Amsterdam pp. 209
128. Robinson, C., Strey, F., and Talbert, L. (1980) *Biochemistry* 19, 3656
129. Cable, B., and Powell, L. (1980) *Biochemistry* 19, 5679
130. Mitchell, F., Blondin, A., and Green, E. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9967
131. Ioannou, V., and Golding, T. (1979) *Prog. Lipid Res.* 17, 279
132. Loder, J. (1952) In: "The yeast taxonomic study" North - Holland Pub. Co., Amsterdam pp. 713
133. Cobon, G., Crowfoot, P., and Linnane, A. (1974), *Biochem. J.* 144, 265
134. O'Farrell, P. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 4007
135. Saura, A., Lokki, J., Oura, E., and Suomalainen, H., (1979) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 7, 355
136. Bergmayer, H. U., (1975) *Methoden der enzymtischen Analysis* Ed. Chemie Verlag, Weinheim, Bergstrasse.
137. Oura, E., and Suomalainen, H., (1970), *J. Institute of Brewing*, 76, 536
138. Mahler, H., Mackler, B., Grandchamp, S., and Slonimski, P. (1964) *Biochemistry*, 3, 675
139. Mackler, P., Collipp, P., Duncan, H., Appaiji, H., and Huennkens, F. (1962). *J. Biol. Chem.* 237, 2968
140. Folch, J., Lees, M., and Stanley, G., (1957) *J. Biol. Chem.*, 226, 497
141. Skipcki, V., Peterson, R., and Barclay, M. (1964) *Biochem. J.* 90, 374
142. Ratcliffe, J., Hossak, J., Mheeler, G., Rose, A., (1973) *J. Gen. Microbiol.* 76, 445
143. Chapman, G., and Robertson, J. (1977), *J. Am. Oil Chem. Socie.* 54, 195
144. Bligh, E., and Dyer, W. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911
145. De Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattaux, R., and Appolmans, F., (1955) *Biochem. J.* 60, 604
146. Arrigoni, O., and Singer, P. (1962) *Nature (London)* 193, 1256

147. Velours, J., Guerin, B., and Duvert, M. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 295
148. Cosson, J., and Spiridakis, A. (1974) Biochem. Biophys. Research Commun. 59, 1039
149. Kim, C., and Beattie, S. (1973) Eur. J. Biochem. 36, 509
150. Ogur, M., and Rosen, G., (1950) Arch. Biochem., 25, 262
151. Schmidt, G., and Thannhauser, S. (1945) J. Biol. Chem. 161, 83
152. Bradford, M. (1976) Anal. Biochem., 72, 248
153. Lowry, O., Roserbrogh, N., Farr, A., and Randall, J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
154. Kevrešan, S. (1985), Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu
155. Naggert, J. (1983). "Untersuchungen zur Struktur und zum Ausdruck Mitochondrieller DNA in Hefe" Der naturwissenschaftlichen Fakultaten der Friedrich + Alexandar - Universtat Erlangen - Nurnberg, zur Erlangen des Doktorgrades.
156. Harris, W., and Popat, P. (1954) J. Am. Oil. Chem. Soc. 31, 124
157. Kremmer, T., and Ferenczy, E. (1969). Chromatographia, 6, 246
158. Mangold, K. (1960) J. Am. Oil. Chem. Soc. 37, 383
159. Redman, C., and Keenana, W. (1964) J. Chromatog. 15, 288
160. Vrbaški, Lj. (1976). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
161. Mueller, M. (1983) "Lipid-protein and protein-protein interaction in the inner mitochondrial membrane" Doctor dissertation, Institute of Technology Zurich
162. Lynn, J., and Smith, F. (1957) J. Bact., 74, 811
163. Chester, V.E. (1955) Nature, London, 183, 902
164. Chester, V.E. (1959) Nature, London, 184, 1956
165. Grba, S. (1976) Doktorska radnja, Tehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, 1976.
166. Trevelyan, W., and Harrison, J. (1956) Biochem. J. 62, 177
167. Miguee da Rocho-Leoa, M., and Panak, A. (1972) Analis da Academia Brasilier de Ciencias 44, 571
168. Rothman, L., and Cabib, E. (1969), Biochemistry 8, 3332
169. Panek, A.D. (1963), Arch. Biochim Biophys. 100, 422
170. Panek, A.D. (1974) Proc. of the 4th. Int. Symp. on Yeast Vienna, Part I. (str. 63).
171. Kotyk, A., and Kleinzeller, A. (1967), Biochim. Biophys. Acta., 135, 106
172. Heredia, C., Sols, A., and Dela Fuente, G. (1968). Eur. J. Biochem. 5, 321

173. Busturia, A., and Lagunas, R. (1986), *J. Gen. Microbiol.* 132, 379
174. Ephrussi, B. (1956) Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms: their bearing on cell heredity and differentiation, Clarendon Press, Oxford pp. 128
175. Bisson, L., and Frankel, D. (1984), *J. Bact.* 159, 995
- * 176. Kovač, L., Lachowicz, M., and Slonimski, P. (1967) *Science* 158, 1564
177. Oura, E. (1976), *Biotechnol. Bioeng.* 18, 415
178. Siebenlist, K., and Taketa, F. (1983), *Biochemistry* 22, 4229
179. Darrow, R., and Colowik, S. (1962) In: "Methods in Enzymology", (P. Colowik and N. Kaplan eds.) Vol V pp 226, Academic Press, N.Y.
180. Blumenthal, J., Vewis, F., and Weinhouse, S. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76, 6093
181. Osmond, C., and Res, T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 35
182. Goodman, M., and Stuber, C. (1983) In: "Maize isoenzymes in plant Genetics and Breeding". Elsevier Sci. Publ. B.V. Amsterdam Part B. pp. 1
183. Harris, H., and Hopkins, D., (1972) *J. Human. Genet.* 36, 9
184. Scherman, F. (1963) *Genetics* 48, 375
185. Ephrussi, B. (1953) In: "Nucleo-cytoplasmic Relations in Microorganisms" Clarendon, Oxford.
186. Kovač, L., and Weissova, K. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 153, 55
187. Oura, E. (1974) *Biotechnol. Bioen.* XVI, 1197
188. Dawson, P., and Craig, B. (1966) *Can. J. Microbiol.* 12, 775
189. Hunter, K., and Rose, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*
190. Jollow, D. Kellerman, G., and Linnane, A. (1968) *J. Cell Biol.* 37, 221
191. Soumalainen, H., and Nurminen, T. (1969). *FEBS 6th, Madrid Abstr. Commun.* pp. 65
192. Cottrel, M., Viljoen, B., Kock, J., and Lategan, P. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 2401
193. Lichko, L., and Okorokov, L. (1985) *FEBS Letters*, 187, 349
194. Matijašević, Z. (1982) Ispitivanje mutagenog delovanja herbicida primenom mikrobnog testa-sistema, Doktorska disertacija, Sveučilišta u Zagrebu.
195. Zimmermann, F. (1975) *Mutation Res.* 31, 71
196. Bilinski, C., Sills, M., and Graham, S. (1984), *Appl. Environ Microbiol.* 48, 813

197. Ephrussi, B., Slonimski, P., and Yotsuyangi, Y. (1955) Nature, 176, 1207
198. Williams, M., Lingern, C., and Yuasa, A. (1956), Nature, 177, 1041
199. Watson, K., Haslam, J., and Linnane, A. (1979) J. Cell Biol. 46, 88
200. Ooi, G., and Nagley, P. (1986), Curr Genet, 10, 713
201. Tuppy, H., and Swetly, P. (1968) Biochim. Biophys. Acta 153, 293
202. Cottrell, M., Kock, F., Lategan, M., Botes, J., and Britz, J. (1985) Microcrob. Letters, 30, 373
203. Kock, J., Lategan, M., Botes, J., and Viljoan, C. (1985) J. Microbiol. Methods 4, 147
204. Moss, W., Shinoda, T., and Samueles, W. (1982) J. Clinic. Microbiol. 6, 1073
205. Erwin, J., and Bloch, K. (1964) Science, 143, 1006
206. Getz, S., Bartley, F., Stripe, M., Notton, B., and Renshaw (1962) Biochem. J. 83, 181
207. Lester, R. (1963) Federation Proc. 22, 415
208. Kovačević, Z. (1979) U: "Molekularna organizacija i funkcija mitohondrija". Naučna knjiga Beograd, str. 11
209. Moss, P., Rickard, D., and Bush, F. (1971) Biotech. Bioeng. XIII, 63
210. Šubik, J., Kužela, S., Kolarov, J., Kovač, L., and Lachowicz, T. (1970) Biochim. Biophys. Acta 205, 513
211. Moore, S., and Stein, H. (1954) J. Biol. Chem. 211, 37
212. Petrović, S., i Bečarević, A. (1977), Matica srpska - Zbornik za prirodne nauke 52, 255
213. Arandjelović, D. (1974) Disertacija, Univerzitet u Zagrebu
214. Singer, P. (1956) J. Biol. Chem. 223, 599
215. OECD (1986) Existing Chemicals Systematic Investigation, Priority setting and Chemicals Reviews OECD, Paris



B I O G R A F I J A

Draginja (Milenka) Peričin, rođena je 17. avgusta 1947. u Perlezu.

Osnovnu školu završila je u svom rodnom mjestu, a Srednju tehnološko-tehničku školu u Zrenjaninu. Diplomirala je na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu 1971. godine. Magistarski rad pod naslovom *Ispitivanje strukture i funkcije alkoholdehidrogenaze kvasca* odbranila je 1977. godine na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu.

Na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu zaposlila se 1973. godine u svojstvu asistenta na predmetu biohemije, gde se i danas nalazi.

Mr Draginja Peričin ima 37 objavljenih naučnih radova i saopštenja na naučnim kongresima u zemlji i inostranstvu.