

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS



Biochemijos magistratūros studijų programos II kurso studentas

Eivydas Andriukonis

Magistrinis darbas

**Streso sąlygomis augančių mielių aminorūgščių profiliavimas
naudojant izotopų santykio masių spektrometriją**

Darbo vadovas

Doc. dr. Arūnas Stirkė

Mokslinis konsultantas

Prof. Vidmantas Remeikis

Vilnius, 2017

SANTRAUKA

Junginiams specifinių stabilių izotopų analizė vis dažniau naudojama ir metabolizmo tyrimams. Izotopų analizė specifinė aminorūgštims (a.r.) išskirtomis iš gyvų organizmų gali padėti nustatyti fiziologinius pokyčius, susijusius su pakitusiais biocheminių procesų greičiais, atsirandančiais ligų ar streso atveju. Vienas iš plačiai nagrinėjamų veiksnių yra oksidacinis stresas. Tyrimo objektu pasirinkti penki izogeniniai mielių ląstelių *Saccharomyces cerevisiae* kamienai, kurie pasižymi jautrumu oksidaciniam stresui. Šiame darbe tyrinėti ir tobulinti metodai skirti atlikti a.r. izotopinę analizę pasitelkiant dujų chromatografiją, kombinuotą su masių spektrometrija ar izotopų santykio masių spektrometrija. Atlikti eksperimentai pritaikant ir tobulinant a.r. išskyrimo, derivatizacijos ir jų chromatografijos metodus. Sukurtas ir standartizuotas oksidacinio streso sukėlimo metodas mielių ląstelėms. Atlikta a.r. izotopinė analizė skirtingiems mielių ląstelių kamienams, augintiems oksidacinio streso sąlygomis. Stebėti skirtingi ir kamienui unikalūs a.r. izotopų santykio pokyčiai esant streso sąlygoms. Nustatyta, kad oksidacinio streso metu, katalazių fermentų neturintiems kamienams, a.r. izotopų santykis tiek $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ tiek $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pakinta kur kas daugiau negu tuose kamienuose, kuriuose pastarieji fermentai yra. Atlikta izotopinė analizė a.r. išskirtoms iš skirtingų a.r. domenų. Nustatyta, kad aminorūgštis patiria didesnius izotopinius pokyčius laisvų bei išskirtų iš tirpaus proteomo a.r. frakcijose. Tuo tarpu netirpiame proteome esančios a.r. izotopų atžvilgiu menkai pakinta.

SUMMARY

Amino Acid Profiling of Yeast Grown in Stressful Conditions Using Isotope Ratio Mass Spectrometry

Eivydas Andriukonis

Compound specific stable isotope analysis recently was one off the main applied tools in metabolomics studies. Amino acid (AA) specific isotope analysis of biological extracts may help to understand development or find specific markers for diseases or other stressors. One of these stressors, which is still widely researched, is oxidative stress. This study deals with development and application of methods needed to perform and master isotopic analysis with gas chromatography followed by mass spectroscopy or isotope ratio mass spectroscopy. Herein described experiments deals with development and application of AA extraction, purification, derivatization and gas chromatography methods. Standardized oxidative stress method was developed and used to collect affected yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. Stable isotope analysis were performed on AA extracts acquired from different yeast strains grown in elevated oxidative stress conditions. Evaluated different and strain – unique AA isotope ratio shifts in cells grown on stress. Results show that oxidative stress does greater impact on isotope ratio in those yeast strains which does not possess catalase type enzymes. Isotopic ratios of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ are prone to change more in mentioned strains compared to those which did have catalases. AA specific isotope analysis were also performed on AA extracted from different AA domains. It was found out that AA undergo larger isotopic shift in those domains, which are more dynamic: free AA and AA of soluble proteome. Though AA which belong to insoluble proteome are more resilient to isotopic changes.