

Izučavanje neurodegenerativnih bolesti na kvascu kao modelnom organizmu

Škara, Josip; Nadalin, Sergej; Buretić-Tomljanović, Alena; Blagović, Branka

Source / Izvornik: **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2016, 52, 15 - 27**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:973115>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



Izučavanje neurodegenerativnih bolesti na kvascu kao modelnom organizmu

The study of neurodegenerative diseases on yeast model

Josip Škara¹, Sergej Nadalin², Alena Buretić-Tomljanović², Branka Blagović^{1*}

¹Zavod za kemiju i biokemiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

²Zavod za biologiju i medicinsku genetiku,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Rijeka

Sažetak. U ovom su radu opisani mogući mehanizmi uključeni u nastanak najčešćih neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerove, Huntingtonove i Parkinsonove) s posebnim naglaskom na istraživanjima etiopatogeneze i suvremenih terapijskih mogućnosti provedenih na kvascu kao modelnom organizmu. Kombinacija jednostavnosti eksperimentalnog pristupa, visokog stupnja očuvanosti metaboličkih puteva s višim eukariotima te relativne jednostavnosti genoma, proteoma i lipidoma čine kvasac idealnim modelnim organizmom za izučavanje homeostaze i funkcije proteina i lipida, između ostalog i u neurodegenerativnim bolestima. Kvasac predstavlja puno jednostavniji no ipak biološki kompletan sustav na kojem se mogu provoditi temeljna istraživanja različitih utjecaja – kako genetskih tako i okolišnih – na brži, jeftiniji i etički prihvatljiviji način u usporedbi sa životinjskim modelima. S obzirom na to da novija istraživanja upućuju na poremećaj dinamike mitohondrija u navedenim bolestima, u radu je detaljnije obrađena uloga mitohondrija u mogućoj etiopatogenezi različitih neurodegenerativnih procesa. Kako je jedna od zajedničkih značajki neurodegenerativnih bolesti poremećena homeostaza membranskih proteina i lipida, uključujući one mitohondrijske, a zbog sve više dokaza o važnosti lipida ne samo za građu, već i za funkcioniranje membranskih sustava, u radu su detaljnije prikazani mehanizmi djelovanja membranskih lipida. Naposljetku, s obzirom na složenost i heterogenost metabolizma lipida, opisane su razlike u glavnim metaboličkim putovima lipida između sisavaca i kvasaca.

Ključne riječi: kvasac; membranski lipidi; membranski proteini; mitohondriji; neurodegenerativne bolesti

Abstract. This paper describes the possible mechanisms involved in the development of the most common neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's), with special emphasis on the research of their etiopathogenesis and modern therapeutic methods, conducted on yeast as a model organism. The simplicity of experimental approach, high degree of conservation of metabolic pathways from higher eukaryotes and the relative simplicity of genome, proteome and lipids, make yeast an ideal model organism for the study of homeostasis and function of proteins and lipids, including in neurodegenerative diseases. Yeast is a much simpler yet complete biological system in which basic research of various influences – both genetic and environmental – can be carried out in faster, cheaper and ethically more acceptable manner compared with animal models. Given that recent studies discovered disordered mitochondrial dynamics in these diseases, the paper also elaborates the role of mitochondria in the possible etiopathogenesis of different neurodegenerative processes. Another common feature of neurodegenerative diseases is disturbed homeostasis of membrane proteins and lipids. Because of the increasing evidence of lipid importance for normal functioning of the membranous systems, the paper presents the mechanisms of action of membrane lipids. Finally, since lipid metabolism is very complex, we describe differences in the main metabolic lipid pathways between mammals and yeasts.

Key words: membrane lipids; membrane proteins; mitochondria; neurodegenerative diseases; yeasts

***Dopisni autor:**

Prof. dr. sc. Branka Blagović
Zavod za kemiju i biokemiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: branka.blagovic@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

POPIS POKRATA

AD – Alzheimer's disease; ALS – amyotrophic lateral sclerosis; ALA – alpha-linolenic acid (18:3n-3) (alfa linolenska kiselina); AMP – adenosine monophosphate; APP – amyloid precursor protein; ARA – arachidonic acid (20:4n-6) (arahidonska kiselina); ATP – adenosine triphosphate; A β – beta-amyloid protein; PC(16:0/2:0) – 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine; CL – cardiolipin; CoA – Coenzyme A; CTP – choline-phosphate citidyltransferase; DHA – docosahexaenoic acid (22:6n-3) – dokozaheksaenska kiselina; Dnmt1 – DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1; EGCG epigallocatechin gallate, EPA – eicosapentaenoic acid (20:5n-3) – eikozapentaenska kiselina; ER – endoplasmic reticulum; GPI – glycosylphosphatidylinositol; LA – linoleic acid (18:2n-6) – linolna kiselina; HD – Huntington's disease; HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; HTT – Huntingtin gene; htt – huntingtin protein; MUFA – monounsaturated fatty acids – mononezasićene masne kiseline; ND – neurodegenerative diseases; NPC1 – Niemann-Pick Disease, Type C1; NPC2 – Niemann-Pick Disease, Type C2; OA – oleic acid (18:1n-9) – oleinska kiselina; PA phosphatidic acid – fosfatidna kiselina; PC – phosphatidylcholine; PD – Parkinson's disease; PE – phosphatidylethanolamine; PG – phosphatidylglycerol; PI – phosphatidylinositol; PSEN1 – Presenilin-1; PSEN2 – Presenilin-2; PUFA – polyunsaturated fatty acids – višestrukonezasićene masne kiseline; SFA – saturated fatty acids – zasićene masne kiseline; SNCA – synuclein, alpha; SREBP – sterol regulatory element-binding proteins; UPR – unfolded protein response – stanični odgovor na pogrešno smotane proteine.

ORGANIZACIJA STANICE KVASCA

Kvasci pripadaju carstvu gljiva. Već desetljećima izuzetno zanimaju citologe, ponajviše zbog toga što su to jednostanični eukariotski organizmi vrlo jednostavni za uzgoj, a odražavaju složenu staničnu građu viših eukariota¹. Stanica kvasca naziva se blastokonidija, a njeni su osnovni dijelovi, vidljivi pod elektronskim mikroskopom, višeslojna stanična stijenka, periplazmatski prostor, citoplazmatska membrana, mitohondriji, jezgra, ribosomi, glikogenska zrnca, lipidne čestice, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, peroksisomi i vakuole. Stanična stijenka, građena najvećim dijelom od polisaharida značajna je za preživljavanje, rast i razmnožavanje blastokonidije. Za razliku od ostalih eukariota, stanična stijenka kvasca puno je čvršća zbog disulfidnih veza kojima se međusobno povezuju molekule glikoproteina na njenoj površini. U nekih vrsta kvasaca blastokonidije mogu biti okružene još i kapsulom koja je također polisaharidnog sastava. Citoplazmatska membrana kvasca građena je, kao i membrane ostalih eukariota, od fosfolipidnog dvosloja u koji su umetnute molekule drugih lipida kao što su steroli i sfingolipidi, te proteini. Glavni sterol u kvascima je ergosterol, koji kao i kolesterol u životinjskim stanicama ima važnu ulogu u regulaciji čvrstoće, propusnosti i fluidnosti mem-

brana. Kao i u stanicama viših eukariota, većina membrana stanica kvasca sadrži manji udio lipida u odnosu na proteine, što je u mitohondrijima još izraženije. Unatoč tome, lipidi imaju važnu ulogu u funkcioniranju svih membrana, pa tako i membrana mitohondrija.

MITOHONDRIJI: FUNKCIJA, DINAMIKA, ZNAČAJKE MEMBRANSKIH LIPIDA

Različita istraživanja upućuju na poremećenu funkciju mitohondrija kao direktan uzrok ND-a²⁻⁴. Mitohondriji su stanične organele s dvostrukim membranskim sustavom u kojem unutarnja membrana oblikuje nabore (kriste) koji se protežu u matriks mitohondrija. Mitohondriji proizvode najviše energijom bogatih spojeva i to u obliku ATP-a, koji je konačni produkt niza reakcija uključenih u oksidaciju supstrata u citosolu (glikoliza) i mitohondrijima (oksidativna fosforilacija/respiratorni lanac). Također su uključeni u biosintezu masnih kiselina i steroida, β -oksidaciju masnih kiselina, održavanje homeostaze kalcija u citosolu te proizvodnju i pregradnju reaktivnih kisikovih spojeva, a imaju važnu ulogu i u apoptozu^{2,5}. To su dinamične organele, koje se neprekidno spajaju i dijele (fuzija – fizija), cijepaju, bubre i recikliraju. Neuravnotežena fuzija dovodi do izduživanja

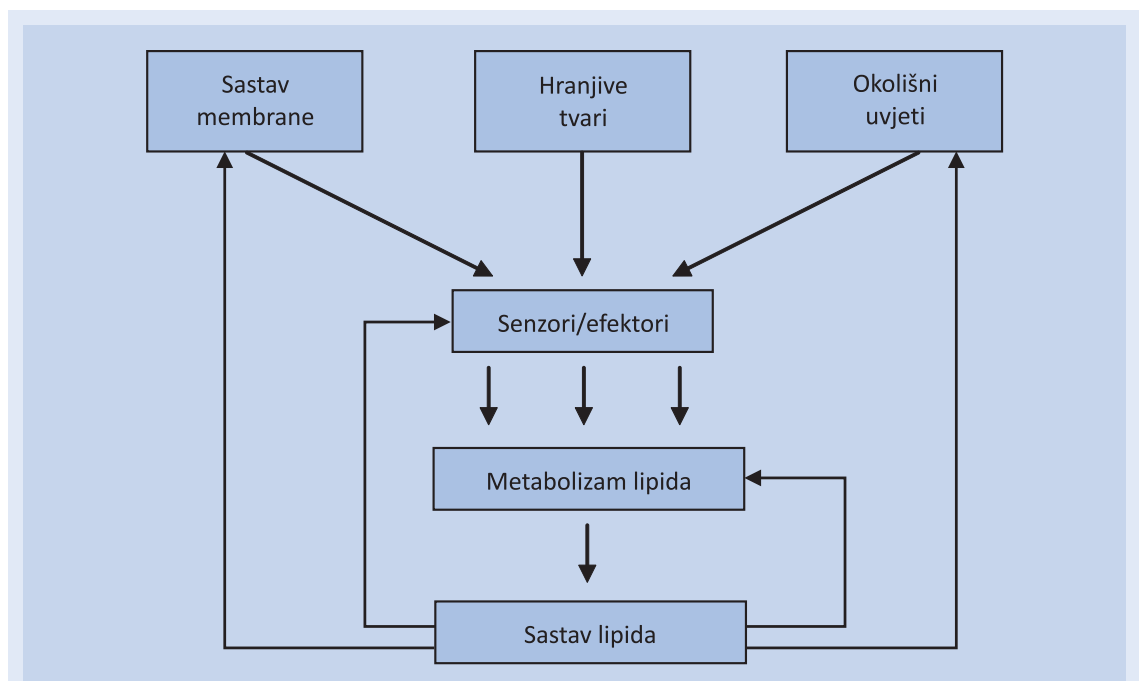
mitochondrija, dok neuravnotežena fizija vodi do prevelike mitohondrijske fragmentacije i nastajanja malenih mitohondrija.

U novije vrijeme potvrđeno je da se u PD-u, HD-u, ALS-u i AD-u radi o poremećenoj mitohondrijskoj dinamici (obliku, veličini, fiziji-fuziji, raspodjeli, gibanju itd.)⁵. Između ostalog, pretpostavlja se da je u sporadičnom AD-u disfunkcija mitohondrija glavni uzrok nakupljanja A β -proteina, sinaptičke degeneracije i stvaranja neurofibrilarnih čvorova. Slabija aktivnost kompleksa I (jednog od transmembranskih proteinskih kompleksa respiracijskog lanca) najprije je utvrđena u središnjem dijelu mozga (lat. *substantia nigra*) pacijenata s PD-om. U pacijenata s HD-om opažena je bioenergijska slabost i disfunkcija mitohondrija, što se manifestira kao izražen gubitak težine usprkos normalnom unosu kalorija. Abnormalni mitohondriji (nabubreni, deformirane kriste, poremećaj u aktivnosti respiratornog lanca i smanjen broj kopija mtDNA) prvi su znaci ALS-a u transgeničnom mišjem modelu⁵.

Iako se kao mogući uzrok nastanka ND-a navodi poremećena homeostaza staničnih, vrlo često mitohondrijskih proteina, nije teško zaključiti da

bi pritom veliku važnost mogli imati i membranski lipidi. Proteini povezani s proizvodnjom energije u mitohondriju obilno su zastupljeni u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, a lipidno okruženje u koje su proteini uronjeni usko je povezano s njihovom funkcijom. Mehanizmi koji upravljaju promjenama u lipidnom sastavu membrana mogli bi biti značajni zbog pretpostavljene uloge membranskih lipida u nastanku i razvoju brojnih bolesti. Slika 1 prikazuje na koji način stanice održavaju lipidnu homeostazu te kako čimbenici poput lipidnog sastava membrana i različitih okolišnih uvjeta utječu na metabolizam i sastav membranskih lipida⁶⁻⁸.

Nedavno je dokazana i funkcijska povezanost različitih vrsta lipida^{7,9}. Osim što su građevni elementi, biofizička svojstva različitih lipida, prisutnih čak i u malim koncentracijama, mogu značajno utjecati na svojstva membrana i na aktivnost pridruženih enzima. Dokazano je da se membranski proteini smještaju u one membranske domene koje posjeduju specifični sastav fosfolipida i sfingolipida, i to ovisno o potrebi stanice za njihovom aktivnošću⁷. Sfingolipidi su, iako značajno manje zastupljeni u odnosu prema fosfolipidima,



Slika 1. Regulacija homeostaze lipida: stanica „osjeća” promjene u fluidnosti i zakrivljenosti membrane i prevodi ih u put kojim inducira odgovarajuću promjenu u sastavu lipida. Na sastav lipida utječu okolišni uvjeti (hranjive tvari te abiotički stresovi, kao temperatura i osmolarnost). Prilagodba se odvija genetičkim i biokemijskim mehanizmima, a promjene u sastavu lipida također mijenjaju sposobnost stanica da odgovore na vanjske uvjete⁷.

krucijalne komponente membrana. Složeni sfingolipidi važni su za pravilno sidrenje proteina vezanih pomoću GPI sidara (organizacija lipidnih splavi), a njihovi metaboliti su važne signalne molekule. Fosfolipidi se s obzirom na svoju građu i oblik mogu podijeliti u dvije skupine, na one „koji tvore dvosloj” i one „koji ne tvore dvosloj” (engl. *bilayer forming* i *non-bilayer forming lipids*). U prvoj skupini su fosfolipidi koji zbog velike polarne glave imaju cilindričan oblik, dok su u drugoj oni koji zbog male polarne glave imaju konusni oblik, zbog čega se nakupljaju u zakrivljenim dijelovima membrana. Zbog različitog oblika fosfolipidi imaju i različit utjecaj na konformaciju proteina s kojima su u dodiru, a time i na njihovu aktivnost¹⁰. Neki lipidi, kao što je to PI, uključeni su u transport vezikula, a neki služe kao glasničke molekule (diacilglicerol, PA i dr.)^{11,12}. U lipidnom sastavu mitohondrija fosfolipidi su najzastupljeniji i to s udjelom i do 90 %. PC i PE su glavni fosfolipidi u obje mitohondrijske membrane, s time da je za unutarnju membranu karakterističan visok sadržaj CL-a, PE-a i PA-a na račun PI-ja i PC-a¹¹. U mitohondrijima nalazimo i ostale lipide, kao što su kolesterol, odnosno ergosterol u kvascima, i sfingomijelin. Mitohondriji sisavaca bogati su nezasićenim masnim kiselinama kao što su: OA, LA, ALA, ARA i DHA, zbog čega su posebno osjetljivi na lipidnu peroksidaciju, budući da se zna da ona eksponencijalno raste s brojem dvostrukih veza¹³. Sastav masnih kiselina u fosfolipidima mitohondrija nije slučajna i razlikuje se ovisno o njihovu položaju u membrani. U pravilu, fosfolipid s najvećim udjelom zasićenih masnih kiselina je PI, dok najveći udio nezasićenih ima PC. U mitohondrijima se sintetiziraju CL i njegov prekursor PG te djelomično PE, dok se većina fosfolipida sintetizira u ER-u i zatim u stanici razvrstava vezikularnim transportom^{11,14}.

Sastav lipida mitohondrija kvasca može varirati ovisno o uvjetima uzgoja. Ako rastu na nefermentabilnoj podlozi, kao što je laktoza, udio fosfolipida, osobito CL-a, značajno raste, zahvaljujući pojačanoj proliferaciji mitohondrija¹¹. Lipidni sastav mitohondrija kvasca ovisi značajno i o fazi rasta. Primjerice, za vrijeme rasta na nefermentabilom mediju, razina PE-a je povišena u logaritamskoj fazi rasta, dok je razina PI-ja povišena u stacionarnoj fazi, neovisno o mediju za rast¹⁵.

CL je fosfolipid karakterističan za mitohondrije, a njime je naročito obogaćena unutarnja membrana mitohondrija. Trivijalno ime dobio je jer je prvi put pronađen u mitohondriju goveđeg srca. Građen je od dva PA-a povezana preko glicerola. I u slučajevima kada je glicerol u ova dva PA-a esterificiran s istim masnim kiselinama, ipak kod CL-a razlikujemo dvije fosfatidilne vrste čije se fosfatne skupine jako razlikuju po kiselosti. Pretpostavlja se da je slaba kiselost drugog fosfata posljedica stvaranja intramolekulske vodikove veze s

Kvasac vrste *S. cerevisiae* sve se više koristi kao modelni organizam u proučavanju fiziologije eukariotskih stanica i molekularnih procesa vezanih uz bolesti u humanoj populaciji. Jedna od značajki, koja ga čini dobrim modelnim organizmom, je to što je jednostanični organizam koji se može brzo i lako uzgojiti u jeftinim medijima, što omogućuje provedbu istraživanja u kontroliranim uvjetima. Budući da je ujedno i eukariotski organizam, posjeduje velik broj gena homolognih genima viših eukariota, a skoro 50 % identificiranih humanih proteina ima homologe u proteomu kvasca. Pored ostalog, kvasci su izvrstan modelni organizam u istraživanju građe, funkcije i biogeneze mitohondrija te dinamike mitohondrija u neurodegenerativnim procesima.

2'-hidroksi skupinom središnjeg glicerola, što je važno za njegovu funkciju. U fiziološkim uvjetima (pH = 7,4) CL ima samo jedan negativan naboj, koji potječe od kiselije fosfatne skupine. U sisavaca, glicerol u CL-u je uglavnom esterificiran s LA-om, osim u mozgu, gdje je esterificiran s ARA-om i DHA-om. Kod kvasaca se, budući da imaju samo Δ^9 -desaturazu, u CL-u nalaze MUFA-e, poput palmitoleinske kiseline (16:1n-7) i OA. Na sastav se može značajno utjecati promjenom uvjeta uzgoja, kao primjerice dodatkom PUFA-a^{11,12,16,17}. CL je jedan od rijetkih fosfolipida čija se biosinteza događa u mitohondrijima. Taj "dvostruki fosfolipid" čini unutarnju mitohondrijsku membranu vrlo nepropusnom za ione, čime omogućuje stvaranje elektrokemijskog protonskog gradijenta¹⁸. CL utječe i na funkcionalnost enzima, osobito onih uključenih u oksidativnu fosforilaciju. Posebno je važan za kvartarnu strukturu kompleksa V (mitohondrijske ATP sintaze), čije podjedinice, kako u

višim eukariotima tako i u kvascu, sadrže čvrsto vezan CL. Uklanjanje CL-a iz membrane vodi cijepanju kompleksa i gubitku funkcionalnosti. Interakcije s brojnim proteinima mitohondrija događaju se zahvaljujući elektrostatskim silama (pozitivno nabijene aminoskupine), vodikovim vezama i van der Waalsovima silama (zahvaljujući masnim kiselinama). Kod mutanata kvasca *S. cerevisiae* kojima nedostaje enzim kardiolipin-sintaza, te zbog toga ne mogu sintetizirati CL, opažena je i smanjena aktivnost citokrom c oksidaze, te nestabilnost citokroma c¹⁹. Druga važna funkcija CL-a je učvršćivanje mitohondrijske kreatin kinaze i nukleozid difosfat kinaze – enzima odgovornih za fosforilaciju supstrata uz pomoć ATP-a – na unutrašnju membranu mitohondrija. Zahvaljujući svojoj bicikličkoj strukturi i negativnom naboju ima važnu ulogu u vezivanju protona oslobođenih redukcijom ubikinona. Zbog interakcije s različitim proteinima koji potiču smrt stanice, uključujući citotokrom c, ima ulogu i u apoptozi. Oksidacijom CL-a, citokrom c otpušta se u međumembranski prostor, aktivira kaspazu, enzim koji cijepa DNA, te je ključan za proces apoptoze^{20,21}. CL usmjerava mitohondrijske proteine koji se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu u mitohondrij, visokospecifično se veže za kromatin sudjelujući tako u regulaciji ekspresije gena, a pretpostavlja se da ima važnu ulogu u prijenosu kolesterola iz vanjske u unutarnju membranu.

RAZLIKE U METABOLIZMU LIPIDA IZMEĐU KVASACA I SISAVACA

Metabolizam lipida prilično je složen, uključuje velik broj metaboličkih reakcija koje obuhvaćaju različite odjeljke u eukariotskoj stanici, što rezultira stvaranjem vrlo heterogene skupine kemijskih spojeva. Iako su osnovni metabolički putevi sačuvani od kvasca do sisavaca, određene razlike postoje. Biosinteza lipida započinje u citosolu od acetil-CoA, koji u sisavaca nastaje uglavnom od citrata, u reakciji kataliziranoj acetil-CoA-liazom koju *S. cerevisiae* nema, ali ima drugi, vrlo učinkovit metabolički put koji vodi do njegova stvaranja. Taj put uključuje dekarboksilaciju piruvata u acetaldehid, koji se zatim pretvara u acetat i acetil-CoA. Aktivirane masne kiseline, acil-CoA, mogu u sisavaca biti prenesene kroz membranu mitohon-

drija kao acil-karnitin, ali *S. cerevisiae*, iako ima sve komponente za transportni sustav karnitina, ne može ga sintetizirati²². Kod sisavaca, u kontroli biosinteze sterola i UFA-a, koja je regulirana na nivou transkripcije, sudjeluju proteini iz porodice SREBP-a. Kvasac ne posjeduje homolog SREBP-a, ali je nedavno otkriveno da posjeduje dva proteina koja imaju sličnu ulogu²².

Glavni produkti biosinteze masnih kiselina su palmitinska (16:0) i stearinska kiselina (18:0) koje se mogu prevesti u odgovarajuće mononezasićene masne kiseline djelovanjem Δ^9 -desaturaze, koja uvodi dvostruku vezu na C-9 atomu. Δ^9 -desaturaza, koja je ujedno jedina desaturaza u kvascu, aktivira se molekulskim kisikom, pa u anaerobnim uvjetima kvasci ne mogu sintetizirati ni MUFA-e čime njihov unos postaje esencijalan^{14,16}. Ovi koraci su isti i u sisavaca, ali oni mogu masne kiseline unesene hranom, na primjer ALA i LA, prevoditi u druge PUFA-e s više dvostrukih veza, čak do ARA-e i DHA-a²². I u kvasca i sisavaca regulacija biosinteze masnih kiselina i sterola je usklađena, što se može objasniti potrebom obje vrste lipida, kako za pravilno funkcioniranje membrana, tako i za njihovu pohranu u obliku sterolnih estera. Pored toga, sisavci imaju dodatni regulacijski mehanizam preko inzulina koji u prisutnosti visoke koncentracije glukoze potiče biosintezu masnih kiselina. Ugradnja masnih kiselina u fosfolipide i triacilglicerole te metaboliziranje masnih kiselina preko β -oksidacije očuvani su između kvasca i sisavaca s time da se ona u sisavaca odvija u mitohondrijima, a u kvasca u peroksisomima. Hidroliza triacilglicerola u čovjeka je katalizirana lipazama, slično kao i u kvasca, s tom razlikom što je aktivnost lipaza regulirana hormonima²³.

U biosintezi fosfolipida ključni međuprodukt je PA, a najzastupljeniji fosfolipid, PC, može se dobiti trostrukom metilacijom PE-a. Ovaj metabolički put je dominantan u kvasca, dok u sisavaca nije, jer nose kolin hranom, a PC i PE mogu nastati i tako da se kolin i etanolamin najprije fosforiliraju, a zatim aktivirani uz pomoć CTP-a reagiraju s diacilglicerolom. Sinteza fosfolipida u kvasca regulirana je inozitolom i kolinom koji imaju represivno djelovanje na gene koji kodiraju enzime za njihovu biosintezu¹¹. Osim pomoću inozitola, CL i PI su

u kvascu regulirani fazom rasta tako da je njihova koncentracija u stacionarnoj fazi rasta nekoliko puta viša u odnosu na ekspanzijsku fazu¹¹.

KVASAC KAO MODELNI ORGANIZAM U NEURODEGENERATIVNIM BOLESTIMA

Kvasac vrste *S. cerevisiae* sve se više koristi kao modelni organizam u proučavanju fiziologije eukariotskih stanica i molekularnih procesa vezanih uz bolesti u humanoj populaciji^{22,24-26}. Jedna od značajki, koja ga čini dobrim modelnim organizmom, je to što je jednostanični organizam koji se može brzo i lako uzgojiti u jeftinim medijima, a što omogućuje provedbu istraživanja u kontroliranim uvjetima. Budući da je ujedno i eukariotski organizam, posjeduje velik broj gena homolognih genima viših eukariota, a skoro 50 % identificiranih humanih proteina ima homologe u proteomu kvasca. Pored ostalog, kvasci su izvrstan modelni organizam u istraživanju građe, funkcije i biogeneze mitohondrija²⁷ te dinamike mitohondrija u neurodegenerativnim procesima³. Za razliku od većine drugih mikroorganizama, kod kvasca postoje stabilne haploidne i diploidne jedinke s mogućnošću spolnog i nespolnog razmnožavanja (pupanja), što omogućuje jednostavnu manipulaciju genima i genski probir. Većina kvasaca, za razliku od mnogih drugih mikroorganizama, nije patogena pa se njima može rukovati s minimalnim rizikom^{22,28}. Kvasci mogu izražavati heterologne gene iz episomnog plazmida ili iz kromosoma i moguće je lako izbrisati, umetnuti (pomoću plazmida) ili mutirati bilo koji slijed u genomu. Osim toga, postoji infrastruktura istraživanja, kao i velik broj tehnologija za sveobuhvatnu analizu. Upravo stoga, sekvenciranje kvaščevog genoma, a koje je u potpunosti provedeno još 1996. godine, predstavlja jedan od iznimno važnih koraka u razumijevanju molekularne biologije eukariotske stanice²⁹. Genom najistraženijeg kvasca, *S. cerevisiae*, veličine je oko $1,2 \times 10^7$ parova baza i sadržava oko 6000 gena raspoređenih na 16 linearnih kromosoma^{29,30}. Iako mnogi geni koji su uključeni u nastanak ND-a ne posjeduju kvaščeve homologe, pa njihovu funkciju nije moguće direktno proučavati na kvaščevu modelu, zahvaljujući tehnologiji rekombinantnog DNA, moguće je postići njihovu heterolognu ekspresiju u kvascu²⁹. Nadalje, u klo-

nirani je gen moguće unijeti bilo kakvu promjenu (kao što je, primjerice, njegova inaktivacija mutacijom) te ispitati učinak mutacije na funkciju gena. Potrebno je istaknuti da je unošenje mutacija u gene kvasaca razmjerno jednostavno, budući da kvasci posjeduju vrlo učinkovit mehanizam homologne rekombinacije³¹.

Osnovni molekularni mehanizmi poput replikacije DNA, regulacije staničnog ciklusa, transporta tvari unutar stanice, smatanja proteina i sl. evulucijski su očuvani od kvasaca do viših eukariota^{30,31}. Iako molekularni mehanizmi etiopatogeneze ND-a još uvijek nisu u potpunosti objašnjeni, brojni dokazi upućuju da su u humanim ND-ima poremećeni temeljni stanični procesi poput smatanja proteina, prometa vezikula i endocitoze^{32,33}. Abnormalno smatanje proteina u njihov pravilan trodimenzionalni oblik, narušen sustav kontrole njihove kvalitete te neravnoteža između stvaranja i degradacije proteina mogu rezultirati formiranjem proteinskih agregata koji su nefunkcionalni, ali i citotoksični za stanicu^{29,31}. Budući da se iz prethodno navedenog moglo zaključiti da je lipidni sastav membrana ključan za funkcionalnost s membranama udruženih proteina i membransku dinamiku u stanici, jasno je da unatoč manjim razlikama u sastavu i metabolizmu lipida stanica kvasca može poslužiti kao odličan model za proučavanje interakcije gena i okolišnih čimbenika u temeljnim staničnim procesima i njihovim poremećajima vezanima za ND čovjeka. U sljedećim odlomcima predstaviti ćemo rezultate tih istraživanja na kvascu kao modelnom organizmu.

Kvasac kao model u Alzheimerovoj bolesti

AD je najčešći ND na koji otpada približno 70 % svih demencija³⁴. Iako postoje manje razlike u geografskoj zastupljenosti, od AD-a obolijeva oko 4 % svjetske populacije starije od 65 godina, a njena se učestalost gotovo udvostručuje svakih 5 godina nakon 65. godine³⁵. Najveći broj slučajeva AD-a javlja se sporadično, dok svega 2 – 5 % slučajeva ima genetičku komponentu te se prvenstveno nasljeđuje autosomno dominantno^{31,35}. Gubitak neurona, koji je najviše izražen u području hipokampusa, dovodi do razvoja karakterističnih simptoma bolesti, kao što su kognitivno propadanje i smetnje ponašanja^{31,36}. U nastanku

AD-a poseban se značaj pripisuje proteinu A β , čija funkcija nije poznata, a koji nastaje proteolitičkim cijepanjem APP-a djelovanjem enzima beta- i gama-sekretaza^{31,36,37}. Prema amiloidnoj hipotezi bolesti, neravnoteža između stvaranja A β iz APP-a te njegovog uklanjanja dovodi do nastanka amiloidnih plakova koji se sastoje od netopivih agregata A β . Formirani amiloidni plakovi se talože između neurona, čime onemogućuju njihovu komunikaciju te posljedično dovode do njihovog propadanja, a također mogu oblagati i sti-

Nedavno je dokazana funkcijska povezanost različitih vrsta lipida. Osim što su građevni elementi, biofizička svojstva različitih lipida, prisutnih čak i u malim koncentracijama, mogu značajno utjecati na svojstva membrana i na aktivnost pridruženih enzima. Dokazano je da se membranski proteini smještaju u one membranske domene koje posjeduju specifičan sastav fosfolipida i sfingolipida, i to ovisno o potrebi stanice za njihovom aktivnošću.

jenke krvnih žila u moždanom tkivu, što rezultira amiloidnom angiopatijom³¹. Najčešće izoforme A β u amiloidnim plakovima su A β 40 i A β 42 koje se sastoje od 40, odnosno 42 aminokiseline, pri čemu A β 42 zbog svoje hidrofobne strukture pokazuje veću sklonost agregaciji^{31,36}. Mutacije u genu APP, ali i u nekim drugim genima, poput gena PSEN1 i PSEN2 čiji proteinski produkti tvore katalitičku podjedinicu kompleksa gama-sekretaze, opisane su u rijetkim nasljednim oblicima AD-a^{31,37}. Prvo istraživanje etiopatogeneze AD-a na kvašćevu modelu provedeno je još 1996. godine. Korištenjem metode kvašćeva sustava dvostrukog hibrida uočena je interakcija između monomera A β u procesu dimerizacije koja predstavlja prvi korak u formiranju amiloidnih plakova³⁸. Kasnije je, također, opaženo da stanice kvasaca u kojima je izražen protein A β 42 pokazuju slabiji rast te da A β 42 potiče odgovor toplinskog šoka u stanicama kvasaca³⁹. Intermedijarne oligomerne forme A β imaju izraženiji toksični učinak od netopivih amiloidnih agregata budući da ometaju endocitozu ovisnu o klatrinu, a interakcijom s transmembranskim receptorima sprečavaju njihovo pravilno sidrenje u membrani³⁶. D'Angelo i sur.⁴⁰ su na modelu kvasca pokazali da je sekrecijski put pro-

teina neophodan za toksičnost proteina A β . Živčane su stanice posebice osjetljive na narušenu homeostazu endocitoze s obzirom na to da se neurotransmiteri, kao i njihovi receptori, neprestano recikliraju³². Budući da je jedna od važnih uloga proteina A β u fiziološkim uvjetima i antioksidacijsko djelovanje, pojačana ekspresija proteina A β upućuje na stanje oksidacijskog stresa u stanicama kvasca. Rad D'Angela i sur.⁴⁰ pokazao je da se A β unutarstaničnim transportom ciljano prenosi do mitohondrija, što podupire hipotezu o ulozi toga proteina u borbi stanice s oksidacijskim stresom. Proteinu A β u pikomolarnoj koncentraciji pripisuju se antimikrobno i neurotrofno djelovanje, uloga aktivacije kinaza, regulacije transporta kolesterola i druge. Nadalje, lipidomskim pristupom na modelu kvasca pokazano je da prekomjerna ekspresija proteina A β 42 remeti metabolizam specifičnih lipida. Konkretno, u kvašćevu modelu AD-a, A β 42 signalizira nakupljanje neurotoksičnog PC(O-16:0/2:0) poznatog i kao C16:0 (engl. *Platelet Activating Factor*) što se može povezati s disfunkcijom neurona i kognitivnim propadanjem u AD-u⁴¹. Toksični lipid remeti sintezu ceramida i drugih sfingolipida koji su građivni elementi lipidnih splavi, dijelova membrane uključenih u regulaciju signalnih procesa u stanici⁴². Važna je činjenica da je protein A β metaloprotein koji neutralizira štetne radikale kisika otpuštajući ione metala i stvarajući pritom vodikov peroksid. To je ujedno jedan od mogućih neizravnih mehanizama toksičnog djelovanja proteina A β u slučajevima kada stanica, zbog oksidacijskog stresa i prekomjerne sinteze, ne može ukloniti suvišan vodikov peroksid uobičajenim mehanizmima³⁶. Istraživanja na kvašćevu modelu omogućila su i bolji uvid u mogućnosti prevencije AD-a. Poseban se značaj pripisuje uporabi folne kiseline, budući da je dokazan inhibicijski učinak folata na formiranje amiloidnih agregata u stanicama kvasaca⁴³.

Kvasac kao model u Parkinsonovoj bolesti

PD je drugi najčešći ND od koje obolijeva oko 2 % populacije starije od 65 godina te čak 5 % populacije starije od 85 godina. Najveći broj slučajeva PD-a javlja se sporadično, dok svega 10 % slučajeva ima genetičku komponentu^{29,36}. Propadanje

dopaminergičkih neurona u središnjem dijelu mozga (lat. *substantia nigra*) ima za posljedicu nastanak karakterističnih simptoma PD-a, a koji uključuju tremor i rigidnost mišića, bradikineziju te posturalnu nestabilnost^{29,44}. U etiologiji PD-a poseban se značaj pripisuje proteinu α -sinukleinu koji je izražen u mozgu, napose u presinaptičkim završecima aksona. Budući da posjeduje domenu vezanja lipida uglavnom je vezan za membrane⁴⁵. Kada nije povezan s membranskim lipidima, ostaje slobodan u citosolu, ali tada mijenja konformaciju. Nepravilno smatanje monomernih formi α -sinukleina u patogenezi PD-a najprije dovodi do nastanka intermedijarnih oligomernih agregata, a oni zatim, daljnjim udruživanjem, formiraju netopive amiloidne fibrile koji se talože unutar živčanih stanica³⁶. U kasnijoj se fazi PD-a obično formiraju i Levijeva tjelešca koja predstavljaju citoplazmatske nakupine netopivog α -sinukleina udruženog s nekim drugim proteinima, poput molekularnih šaperona, ubikvitina i alfa-B kristalina²⁹. Iako se ranije smatralo da su netopivi amiloidni fibrili prvenstveno odgovorni za citotoksičan učinak α -sinukleina, novija istraživanja provedena na kvašćevu modelu ukazuju na veću toksičnost njegovih oligomernih formi, budući da one ometaju unutarstanični transport vezikula, posebice njihovu fuziju s ciljnim membranama³⁷.

Uloga α -sinukleina je u održavanju homeostaze u središnjem živčanom sustavu, gdje regulira dinamiku vezikula u sinapsi (egzocitozu i endocitozu) i sinaptičku plastičnost^{29,46}. U tu svrhu α -sinuklein regulira i funkciju aktina u staničnoj kori⁴⁷. Zbog toga agregaciju α -sinukleina prate poremećaji prometa vezikula, ali i homeostaze iona metala, što upućuje na disfunkciju mitohondrija i stanje oksidacijskog stresa u stanici. Novija istraživanja upućuju na visoku koncentraciju α -sinukleina i u unutarnjoj membrani mitohondrija, napose u dijelovima mozga kao što su hipokampus, striatum i *substantia nigra* te stanicama neuroglije^{48,49}. Vezanje α -sinukleina s unutarnjom membranom mitohondrija upliće taj protein i u procese suočavanja stanice s oksidacijskim stresom i neutralizacije slobodnih radikala.

mehanizama uključenih u etiopatogenezu PD-a^{2,29,36,50,51}. U kvašćevu modelu PD-a, kao i drugih sinukeinopatija, u membranama su utvrđeni nedostatak sterola kao i redukcija duljine lanaca masnih kiselina membranskih fosfolipida^{52,53}. Kraći lanci masnih kiselina (većinom sastavljeni od 16 atoma ugljika, dok nedostaju oni s 18 atoma) utvrđeni su u mutantama kvasaca kojima nedostaju peroksisomi, a koji pokazuju specifične metaboličke promjene. Iz tih se rezultata može zaključiti da se α -sinuklein slabije veže s membra-

Mogućnost da proučavamo uzroke i razvoj neurodegenerativnih bolesti na modelu kvasca upućuje nas da su u tim bolestima poremećeni temeljni stanični procesi ključni za preživljavanje stanica. Glavni mehanizam neurodegeneracije uključuje oksidacijski stres i prekomjerno stvaranje slobodnih radikala koje stanice mozga ne uspijevaju neutralizirati dostupnim staničnim mehanizmima. Kako su mitohondriji glavna, iako ne i jedina mjesta stvaranja slobodnih radikala zbog uporabe kisika, disfunkcija mitohondrija bitna je i zajednička značajka niza neurodegenerativnih, a moguće i drugih bolesti.

nama u slučaju nedostatka specifičnih lipida, odnosno nepravilnog lipidnog sastava membrana, a kao posljedica javlja se poremećaj unutarstaničnog membranskog prometa⁵⁴. U prilog tome svjedoči nalaz u kvašćevu modelu koji potvrđuje da veća koncentracija sterola u membranama djeluje citoprotektivno, odnosno, usporava napredovanje sinukeinopatija⁵². Istraživanje Wang i sur.⁵³ otkriva povezanost nedostatka PE-a i poremećaja homeostaze α -sinukleina. Kvasac, kome zbog mutacije nedostaje enzim fosfatidilserin karboksilaza, posrednik u sintezi PE-a, karakteriziraju usporen rast i disanje, stres ER-a te akumulacija α -sinukleina. Budući da je glavno mjesto sinteze PE-a, u nekim stanicama, unutarnja mitohondrijska membrana, ovi rezultati svjedoče u prilog povezanosti specifičnih lipidnih deficita u membranama sa znakovima oksidacijskog stresa u stanici. Stanje oksidacijskog stresa – zbog povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva – aktivira toplinski odgovor stanice, stres ER-a, potiče mehanizme apoptoze, inhibira funkciju ubikvitinsko-proteasomnog sustava – važnog

kontrolnog sustava kvalitete staničnih proteina – te pojavu abnormalne konformacije i funkcija s membranom udruženih proteina^{37,55,56}.

U obiteljskim oblicima PD-a najčešće su opisane točkaste mutacije u genu SNCA (A53T, A30P, E46K) koji kodira α -sinuklein i nalazi se na kromosomu 4 (4q21)⁵⁷⁻⁵⁹. Mutacije u genu SNCA mogu uzrokovati pogrešno posttranslacijsko fosforiliranje α -sinukleina, što utječe na pravilan razmještaj proteina u stanici, iako postoje i drugi mehanizmi⁶⁰. Tako je za varijantu gena SNCA-A53T uočeno da posjeduje slabiji afinitet vezanja za membrane, ali nije utvrđen njezin citotoksičan učinak na stanice kvasaca³⁷. Uočeno je da lokalizacija proteina α -sinukleina u stanicama kvasca ovisi o genskoj dozi, ali i o vrsti mutacije u genu SNCA^{37,50}. Ako je, primjerice, u kvascu prisutna samo jedna kopija divljeg tipa gena SNCA, ili njegove mutirane varijante A53T, protein α -sinuklein ostaje u najvećoj mjeri vezan za membrane. Prisutnost mutacije A30P u genu SNCA slabi afinitet vezanja α -sinukleina za membranu te je u tom slučaju, neovisno o genskoj dozi, glavnina α -sinukleina koncentrirana u citoplazmi.

Naposljetku, istraživanja na kvašćevu modelu omogućila su i uvid u terapijske mogućnosti kod PD-a, pri čemu se poseban značaj pripisuje molekulama iz skupine biljnih pigmenta flavonoida, kao što su EGCG i kvercetin. Pokazalo se da navedene molekule mogu smanjiti citotoksičan učinak α -sinukleina u stanicama kvasca zahvaljujući svojoj antioksidacijskoj aktivnosti i kelirajućim svojstvima^{2,61}.

Kvasac kao model u Huntingtonovoj bolesti

HD je nasljedna autosomno-dominantna bolest zrele dobi. Javlja se između 30. i 50. godine života, nakon čega slijedi period postupnog pogoršavanja simptoma koji nakon jednog ili dva desetljeća dovode do smrti⁶². Učestalost obolijevanja od HD-a u europskoj populaciji iznosi oko 5 : 100 000, pri čemu epidemiološka istraživanja ukazuju na značajne razlike u javljanju bolesti među pojedinim populacijama. Tako se HD češće javlja u populaciji zapadnoeuropskog podrijetla u odnosu na ostale europske populacije, dok je njena učestalost značajno niža u azijskoj populaciji, posebice među stanovništvom Kine i Japana te u populaciji afričkih crnaca⁶³. Karakteristični simptomi

Huntingtonove bolesti, kao što su nevoljni pokreti, psihičke promjene i progresivno kognitivno propadanje, posljedica su gubitka neurona u određenim dijelovima mozga, napose u području *striatuma*, koji biva najranije zahvaćen, ali i u području bazalnih ganglija te kore velikog mozga i malog mozga^{31,62}. HD posljedica je mutacije gena HTT, koji se nalazi na 4. kromosomu (4p16.3) i kodira istoimeni protein čija je visoka ekspresija uočena u brojnim dijelovima mozga, ali i u drugim tkivima^{29,62}. Iako funkcija htt-a još uvijek nije poznata, istraživanja upućuju na njegovu važnost u embriogenezi, staničnom transportu i procesu prijenosa signala u stanicama^{62,64}. Prisutnost mutacije u genu HTT dovodi do ekspanzije tripleta CAG slijeda (citozin-adenin-guanin) za aminokiselinu glutamin, što rezultira stvaranjem produljenog proteina htt-a zbog povećane poliglutaminske regije^{29,62}. Broj ponavljanja tripleta CAG kreće se u rasponu od 9 do 35 u zdravih ljudi, dok je kod pacijenata pronađeno od 36 do čak 121 ponavljanja^{31,62}. Mutirani htt cijepaju proteolitički enzimi, pri čemu nastaju fragmenti koji zadržavaju povećani broj glutamina, a njih, nakon konjugacije s ubikvitinom, razgrađuje proteasom. Razgradnja je nepotpuna pa se dijelovi htt-a i proteasoma povezuju te tvore citotoksične agregate^{62,65}.

Istraživanja etiopatogeneze HD-a na kvašćevu modelu pokazala su značajnu pozitivnu povezanost između formiranja agregata htt-a i broja glutaminskih ostataka u genu HTT, a uočeno je i da htt koji posjeduje 25 glutaminskih ostataka, što odgovara strukturi normalnog proteina, ne sudjeluje u formiranju agregata^{29,37}. Dokazano je da toksičnost mutiranog htt-a ovisi o pojačanoj ekspresiji proteina nalik prionima čije je postojanje dokazano u kvascu^{66,67}. To su proteini koji posjeduju sklonost stvaranja agregata (sadrže regije bogate glutaminom i asparaginskom kiselinom) koji mogu vezati druge proteine te poticati njihovo nakupljanje. Citotoksičnost mutiranog htt-a na stanice kvasca mogla bi biti posredovana disfunkcijom mitohondrija, posljedičnim pojačanim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva, pokretanjem mehanizama apoptoze, abnormalnostima u procesu endocitoze i vezikularnog transporta, disfunkcijom ubikvitin-proteasomskog sustava te aktivacijom kinureninskog puta^{29,31,37}. Nedavno uočeno

na značajno viša koncentracija metabolita, poput alanina, glutamina, glicerola i valina u stanicama kvasca u kojima je bio izražen mutirani htt koji je sadržavao 103 glutaminska ostatka, ukazuje na navedene metabolite kao neke od potencijalnih biomarkera u HD-u⁶⁸. Čini se da bi prethodno spomenuti EGCG mogao imati važnu ulogu i u terapiji HD-a. Tako je uočeno da su stanice kvasca u kojima je bio izražen htt s velikim brojem glutaminskih ostataka (N = 72) tretirane EGCG-om rasle značajno brže u odnosu na stanice tretirane običnim otapalom. Nadalje, na kvašćevu modelu HD-a opažen je i negativan učinak EGCG-a na formiranje proteinskih agregata⁶⁹. Vrlo je vjerojatno da su u stanicama kvasca aktivni različiti mehanizmi toksičnog djelovanja mutiranog htt-a.

UČINAK OKOLIŠNIH ČIMBENIKA NA RAZVOJ NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI

Prethodna rasprava upućuje na važnost okolišnih čimbenika u razvoju ND-a. Poseban značaj pripisuje se teškim metalima, zagađenom zraku, pesticidima te hrani⁷¹. Sve se više nameće zaključak da je oksidacijski stres jedan od glavnih uzroka, a ne popratni fenomen patološkog procesa⁷². Pod oksidacijskim stresom podrazumijevamo stanje u kojem stanična antioksidacijska obrana nije dovoljna da zadrži koncentraciju reaktivnih kisikovih radikala ispod toksične granice, a posljedice su peroksidacija lipida, oksidacija proteina i nukleinskih kiselina. Čini se da je peroksidacija mitohondrijskih lipida neurona, osobito kardiolipina, jedan od važnih čimbenika u patogenezi neurodegenerativnih procesa⁷³. Moždano tkivo mnogo je osjetljivije na oksidacijski stres u odnosu na ostala tkiva zbog povećane potrošnje kisika⁷⁴, ali i zbog činjenice da mitohondrijski lipidi neurona sadrže visok udio PUFA-a koje su podložnije peroksidaciji.

Budući da su u kritičnim regijama mozga oboljelih od ND-a pronađene značajne količine teških metala, nameće se zaključak da bi i teški metali mogli imati važnu ulogu u patologiji ND-a⁷². Dokazano je da bakar, cink i željezo utječu na strukturu proteina uključenih u neurodegeneraciju budući da su to metaloproteini, a mogu poticati oksidacijski stres⁷⁵. Ioni metala nužni su za fenomen neurotoksičnosti⁴². Teški metali mogu stvarati reaktivne kisikove radikale ili zamjenjivati metale u

enzimima koji sudjeluju u antioksidacijskoj obrani, poput superoksid-dizmutaze, i inhibirati ih, te tako neizravno uzrokovati oksidacijski stres²¹. Mineraloška istraživanja u Istri i Gorskom kotaru pokazala su da su tla u tim područjima obogaćena teškim metalima⁷⁶, a upravo su ta područja žarišta multiple skleroze u Hrvatskoj. Učestalost u okolici Čabra u Gorskom kotaru iznosi 150 : 100.000, a u Istri 29 : 100.000⁷⁰.

Osim teških metala, utvrđena je snažna povezanost između izloženosti pesticidima i ND-a⁷⁷. Između ostalog, dokazana je veza između njihove etiologije i dugoročne izloženosti niskim koncentracijama pesticida poput parakvata, maneba, dieldrina, piretroida i organofosfata. Većina ovih pesticida ima slična svojstva, kao što je sposobnost da potaknu oksidacijski stres, disfunkciju mitohondrija i propadanje neurona⁷⁸.

Pronađeno je da se povećani rizik obolijevanja od MS-a povezuje i s većim unosom hrane životinjskog podrijetla, jer se incidencija bolesti poklapa s pretjeranim unosom SFA-a⁷¹. Poznato je da su masne kiseline vrlo moćni medijatori upalnih procesa u organizmu. Masne kiseline iz prehrane (SFA, MUFA i PUFA) moduliraju ravnotežu proupalnih i antiupalnih prostaglandina i citokina. PUFA-e iz obitelji n-3 i njihovi derivati pokazuju protektivni učinak dok PUFA-e iz obitelji n-6 i njihovi derivati djeluju proupalno. PUFA-e dugoga lanca sintetiziraju se iz esencijalnih masnih kiselina koje se u organizam moraju unijeti prehranom. Prehrana koja obiluje SFA-om i onima iz obitelji n-6 PUFA-a suprimira sintezu dugolančanih PUFA-a iz obitelji n-3, pa na taj način pridonosi razvitku upalnih procesa. Izrazito antiupalno djeluju dugolančane PUFA-e, EPA-e i DHA-e i njihovi derivati, dok ARA i njezini derivati djeluju suprotno. Povezanost metabolizma masnih kiselina u organizmu i razvitka ND-a važna je s obzirom na činjenicu da su masne kiseline prekursori proupalnih i antiupalnih spojeva⁷⁹. To je neobično važno, jer su neurodegenerativne ujedno i upalne bolesti⁸⁰.

RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Mogućnost da proučavamo uzroke i razvoj ND-a na modelu kvasca upućuje nas da su u tim bolestima poremećeni temeljni stanični procesi ključni za preživljavanje stanica. Glavni mehanizam

neurodegeneracije uključuje prekomjerno stvaranje slobodnih radikala te dugotrajan oksidacijski stres koji stanice mozga ne uspijevaju neutralizirati dostupnim staničnim mehanizmima. Kako su mitohondriji glavna, iako ne i jedina, mjesta stvaranja slobodnih radikala zbog uporabe kisika, disfunkcija mitohondrija bitna je i zajednička značajka niza, a moguće i svih ND-a. Disfunkcija unutarnje membrane mitohondrija, osim stvaranja slobodnih radikala, uzrokuje i nemogućnost „praćenja” unutarstanične razine iona kalcija. Mitohondrij detektira promjene koncentracije iona kalcija u citosolu, te može pokrenuti apoptozu, dok u fiziološkim uvjetima istim mehanizmom regulira preživljavanje stanica. Novija istraživanja pokazala su da, osim disfunkcije unutarnje mitohondrijske membrane, postoji abnormalna funkcija drugih membranskih sustava te poremećaji endocitoze i egzocitoze. Disfunkcija membrana izražava se kao disfunkcija mnogih s membranama udruženih proteina. Istraživanja su pokazala da membranski proteini prepoznaju i specifično se združuju s pojedinim lipidnim komponentama. To bi značilo da lipidno okružje, odnosno lipidni sastav membrana, omogućuje njihovu pravilnu funkciju. Činjenica da neurodegeneraciju prate poremećaji stanične signalizacije upućuje ponovno na poremećaj u sastavu membranskih lipida, posebice na poremećaje organizacije i funkcije lipidnih splavi koje uobičajeno posreduju u staničnim signalnim procesima. Nedostatak kolesterola, koji je uz sfingolipide glavni gradivni element lipidnih splavi, onemogućuje organizaciju tih membranskih domena, ugradnju integralnih proteina u splav, te utječe na procese smatanja proteina⁸¹. Pogrešno smatanje proteina također je povezano s disregulacijom koncentracije iona kalcija u citosolu⁸². Činjenica je da je u mnogim, a moguće i svim ND-ima poremećen temeljni stanični proces uklanjanja nepravilno smotanih proteina. Smatanje proteina je senzorna točka koja stanici signalizira stanje homeostaze ili stresa. Proteini koji zaostaju u citosolu, umjesto specifičnog vezanja s membranama, poprimaju abnormalnu konformaciju, a budući da su mehanizmi uklanjanja neučinkoviti, formiraju agregate. Stoga se ND mogu sma-

trati i bolestima smatanja proteina. UPR je kvalitativna kontrolna točka za proteine, a započinje u ER-u. Kako je uloga ER-a, među ostalim, sinteza različitih vrsta lipida i održavanje lipidnog sastava membranskih sustava u stanici, evidentno je da bi stres ER-a mogao biti uvjetovan abnormalnim metabolizmom lipida. Kako su u ND-u potvrđeni deficiti ili poremećaji metabolizma specifičnih lipida (kolesterola, fosfolipida i/ili sfingolipida) navedeni rezultati upućuju na zaključak da bi neurodegenerativne bolesti mogle biti bolesti specifičnih lipidnih deficita⁸³⁻⁸⁶. U prilog tome svjedoči i činjenica da se u Niemann-Pickovoj bolesti tipa C, u kojoj postoji poremećaj metabolizma i signalizacije sfingolipida, javlja neurodegeneracija uz karakteristično nakupljanje kolesterola i sfingolipida u lizosomima i endosomima. U kvaščevu modelu te bolesti, u kojem nedostaju ortolozi gena NPC1 i NPC2 koji reguliraju prijenos lipida tijekom endocitičkog puta, opisani su znakovi oksidacijskog stresa, disfunkcija mitohondrija, niži antioksidacijski kapacitet i kraći životni vijek⁸⁶. Istraživanja na kvascu su, nadalje, pokazala da su UPR i sinteza sfingolipida povezani procesi, odnosno, koordinirano regulirani istim staničnim mehanizmom⁸⁷. Osim u ND-u, poremećaj smatanja proteina i uklanjanja nepravilno smotanih proteina utvrđen je i u neuropsihijatrijskim bolestima, a pretpostavlja se da bi mogao biti temelj brojnih drugih bolesti. Mehanizmi koji potiču i suprimiraju UPR u različitim bolestima još nisu dovoljno proučeni⁸⁸. Zaključno, istraživanja na kvascu dovela su do važnih otkrića vezanih uz etiopatogenezu, terapiju i prevenciju ND-a. Model kvasca, unatoč tome što stanice kvasaca ne posjeduju živčani sustav, prikladan je za izučavanje mehanizama uključenih u etiopatogenezu ND-a, budući da su ti mehanizmi vezani uz homeostazu staničnih proteina i lipida te su evolucijski visokočuvani od kvasaca sve do sisavaca. Stanica kvasca predstavlja znatno jednostavniji, ali biološki kompletan sustav za istraživanje utjecaja genetičkih i okolišnih čimbenika na stanične procese i to na etički prihvatljiviji način u usporedbi sa životinjskim modelima.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Bharadwaj P, Martins R, Macreadie I. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res* 2010;10:961-9.
2. Su LJ, Auluck PK, Outeiro TF, Yeger-Lotem E, Kritzer JA, Tardiff DF et al. Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Dis Model Mech* 2010;3:194-208.
3. Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol* 2013;23:64-71.
4. Franco-Iborra S, Vila M, Perier C. The Parkinson disease mitochondrial hypothesis: Where are we at? *Neuroscientist* 2015; Forthcoming.
5. Johri A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342: 619-30.
6. Sonnino S, Aureli M, Loberto N, Chigorno V, Prinetti A. Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases. *FEBS Lett* 2010;584:1914-22.
7. Santos AX, Riezman H. Yeast as a model system for studying lipid homeostasis and function. *FEBS Lett* 2012;586:2858-67.
8. Breslow DK. Sphingolipid homeostasis in the endoplasmic reticulum and beyond. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2013;5:a013326. [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/4/a013326.long>
9. Guan XL, Souza CM, Pichler H, Dewhurst G, Schaad O, Kajiwara K et al. Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol Biol Cell* 2009;20:83-95.
10. De Kruijff B. Membranes, where lipids and proteins meet. *Chemistry and physics of lipids. Abstracts from the 47th International Conference on the Bioscience of Lipids. Chem Phys Lipids* 2006;143:41-2.
11. Rosenberger S, Daum G. Lipids of yeast mitochondria. *In: Daum D (ed). Cell biology and dynamics of yeast lipids. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, 2005;51-83.*
12. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 2013;52:590-614.
13. Matalon S. Free radical effects on membrane lipid peroxidation. *In: Free radical effects on membranes. Matalon S (ed). In: Current topics in membranes. Simon SA, Benos DJ (Series eds). Oxford, Elsevier, 2008;3-35.*
14. Black PN, Tong F, Li H, DiRusso CC. Cell biology of fatty acids in yeast. *In: Daum D (ed). Cell biology and dynamics of yeast lipids. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, 2005; 1-16.*
15. Janssen MJ, Koorengel MC, de Kruijff B, de Kroon AI. The phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine ratio of *Saccharomyces cerevisiae* varies with the growth phase. *Yeast* 2000;16:641-50.
16. Blagović B, Rupčić J, Mesarić M, Marić V. Lipid analysis of the plasma membrane and mitochondria of brewer's yeast. *Folia Microbiol* 2005;50:24-30.
17. Čanadi Jurešić G, Blagović B. The influence of fermentation conditions and recycling on the phospholipid and fatty acid composition of the brewer's yeast plasma membranes. *Folia Microbiol (Praha)* 2011;56:215-24.
18. Pope S, Land JM, Heales SJ. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:794-9.
19. McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:97-107.
20. Choi SY, Gonzalez F, Jenkins GM, Slomianny C, Chretien D, Arnoult D et al. Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death Differ* 2007;14:597-606.
21. Nargund AM, Avery SV, Houghton JE. Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis* 2008;13:811-21.
22. Nielsen J. System biology of lipid metabolism: From yeast to human. *FEBS Lett* 2009; 583:3905-13.
23. Daum G, Wagner A, Czabany T, Athenstaedt K. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie* 2007;89:243-8.
24. Li G, Chen S, Thompson MN, Greenberg ML. New insights into the regulation of cardiolipin biosynthesis in yeast: implications for Barth syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771: 432-41.
25. Meunier B, Fisher N, Ransac S, Mazat JP, Brasseur G. Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1346-61.
26. Pienaar IS, Götz J, Feany MB. Parkinson's disease: insights from non-traditional model organisms. *Prog Neurobiol* 2010;92:558-71.
27. Foury F, Kucej M. Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* 2002;6: 106-11.
28. Allendoerfer KL, Su LJ, Lindquist S. Yeast cells as a discovery platform for Parkinson's disease and other misfolding diseases. *In: Nass R, Przedborski S (eds). Parkinson's disease: molecular and therapeutic insights from model systems. New York: Academic Press, 2008; 505-36.*
29. Tenreiro S, Outeiro TF. Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Res* 2010;10:970-9.
30. Khurana V, Lindquist S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat Rev Neurosci* 2010;11:436-49.
31. Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro TF. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Bio-technol J* 2008;3:325-38.
32. Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, Matlack KE, Chung CY, Baru V et al. Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* 2011;334:1241-5.
33. Soper JH, Kehm V, Burd CG, Bankaitis VA, Lee VM. Aggregation of α -synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *J Mol Neurosci* 2011;43:391-405.
34. Mimica N. Demencija i palijativna skrb. *Neurol Croat* 2011;60:119-23.
35. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and

- strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 2009;11:111-28.
36. Pimentel C, Batista-Nascimento L, Rodrigues-Pousada C, Menezes RA. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2012;132146 [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2012/132146/>
 37. Pereira C, Bessa C, Soares J, Leão M, Saraiva L. Contribution of yeast models to neurodegeneration research. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012;941232. [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/941232/>
 38. Hughes SR, Goyal S, Sun JE, Gonzalez-DeWhitt P, Fortes MA, Riedel NG et al. Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2065-70.
 39. Caine J, Sankovich S, Antony H, Waddington L, Macreadie P, Varghese J et al. Alzheimer's Abeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res* 2007;7:1230-6.
 40. D'Angelo F, Vignaud H, Di Martino J, Salin B, Devin A, Cullin C et al. A yeast model for amyloid- β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PI-CALM in cytotoxicity. *Dis Model Mech* 2013;6:206-16.
 41. Kennedy MA, Gable K, Niewola-Staszewska K, Abreu S, Johnston A, Harris LJ et al. A neurotoxic glycerophosphocholine impacts PtdIns-4, 5-bisphosphate and TORC2 signaling by altering ceramide biosynthesis in yeast. *PLoS Genet* 2014 [Internet]. 2014;1004010. [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004010>
 42. Cárdenas-Aguayo M del C, Silva-Lucero M del C, Cortes-Ortiz M, Jiménez-Ramos B, Gómez-Virgilio L, Ramírez-Rodríguez G et al. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. [Internet]. Rijeka: InTech (Croatia); 2014;46296, Chapter 9, Neurochemistry; Thomas Heinbockel (ed). [cited 2015 Nov 2]; Available from: <http://www.intechopen.com/books/neurochemistry/physiological-role-of-amyloid-beta-in-neural-cells-the-cellular-trophic-activity>
 43. Macreadie I, Lotfi-Miri M, Mohotti S, Shapira D, Bennett L, Varghese J. Validation of folate in a convenient yeast assay suited for identification of inhibitors of Alzheimer's amyloid-beta aggregation. *J Alzheimers Dis* 2008;15:391-6.
 44. Maetzler W, Liepelt I, Berg D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol* 2009;8:1158-71.
 45. Tardiff DF, Jui NT, Khurana V, Tambe MA, Thompson ML, Chung CY et al. Yeast reveal a "druggable" Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. *Science* 2013;342:979-83.
 46. Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J* 2004;18:617-26.
 47. Bellani S, Sousa VL, Ronzitti G, Valtorta F, Meldolesi J, Chieregatti E. The regulation of synaptic function by alpha-synuclein. *Commun Integr Biol* 2010;3:106-9.
 48. Zhang L, Zhang C, Zhu Y, Cai Q, Chan P, Ueda K et al. Semi-quantitative analysis of alpha synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Res* 2008;1244:40-52.
 49. Liu G, Zhang C, Yin J, Li X, Cheng F, Li Y et al. alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci Lett* 2009;454:187-92.
 50. Outeiro TF, Lindquist S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* 2003;302:1772-5.
 51. Dixon C, Mathias N, Zweig RM, Davis DA, Gross DS. Alpha-synuclein targets the plasma membrane via the secretory pathway and induces toxicity in yeast. *Genetics* 2005;170:47-59.
 52. Valastyan JS, Termine DJ, Lindquist S. Splice isoform and pharmacological studies reveal that sterol depletion relocalizes α -synuclein and enhances its toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:3014-9.
 53. Wang S, Horn PJ, Liou LC, Muggeridge MI, Zhang Z, Chapman KD. A peroxisome biogenesis deficiency prevents the binding of alpha-synuclein to lipid droplets in lipid-loaded yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438:452-6.
 54. Soper JH, Kehm V, Burd CG, Bankaitis VA, Lee VM. Aggregation of α -synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *J Mol Neurosci* 2011;43:391-405.
 55. Büttner S, Delay C, Franssens V, Bammens T, Ruli D, Zanuschirm S et al. Synphilin-1 enhances α -synuclein aggregation in yeast and contributes to cellular stress and cell death in a Sir2-dependent manner. *PLoS One* [Internet]. 2010;0013700 [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013700>
 56. Sere YY, Regnacq M, Colas J, Berges T. A *Saccharomyces cerevisiae* strain unable to store neutral lipids is tolerant to oxidative stress induced by α -synuclein. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1755-64.
 57. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-7.
 58. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-8.
 59. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164-73.
 60. Mbefo MK, Fares MB, Paleologou K, Oueslati A, Yin G, Tenreiro S et al. Parkinson disease mutant E46K enhances α -synuclein phosphorylation in mammalian cell lines, in yeast, and in vivo. *Biol Chem* 2015;290:9412-27.
 61. Griffioen G, Duhamel H, Van Damme N, Pellens K, Zaborcki P, Pannecouque C et al. A yeast-based model of alpha-synucleinopathy identifies compounds with therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:312-8.
 62. Pogledić I, Relja M. Huntington's disease. *Lijec Vjesn* 2012;134:346-50.
 63. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2012;27:1083-91.

64. Harper SQ. Progress and challenges in RNA interference therapy for Huntington disease. *Arch Neurol* 2009;66: 933-8.
65. Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999;340: 1970-80.
66. Kochneva-Pervukhova NV, Alexandrov AI, Ter-Avanesyan MD. Amyloid-mediated sequestration of essential proteins contributes to mutant huntingtin toxicity in yeast. *PLoS One* [Internet]. 2012;0029832 [cited 2015 Nov 2] Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029832>.
67. Kantcheva RB, Mason R, Giorgini F. Aggregation-prone proteins modulate huntingtin inclusion body formation in yeast. *PLoS Curr* [Internet]. 2014;6. [cited 2015 Nov 2] Available from: <http://currents.plos.org/hd/article/aggregation-prone-proteins-modulate-huntingtin-inclusion-body-formation-in-yeast/>
68. Joyner PM, Matheke RM, Smith LM, Cichewicz RH. Probing the metabolic aberrations underlying mutant huntingtin toxicity in yeast and assessing their degree of preservation in humans and mice. *J Proteome Res* 2010;9:404-12.
69. Ehrnhoefer DE, Duennwald M, Markovic P, Wacker JL, Engemann S, Roark M et al. Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 2006;15:2743-51.
70. Peterlin B, Ristić S, Sepčić J, Lovrečić L, Brajenović-Milić B, Rudež J et al. Region with persistent high frequency of multiple sclerosis in Croatia and Slovenia. *J Neuro Sci* 2006; 247:169-72.
71. van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, van Tol EA. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:1347-61.
72. Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res* 2009;674:73-84.
73. Pope S, Land JM, Heales SJ. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:794-9.
74. Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 2007;145:1233-48.
75. Kozłowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord Chem Rev* 2012;256:2129-41.
76. Miko S, Durn G, Adamcová R, Čović M, Dubíková M, Skalský R et al. Heavy metal distribution in karst soils from Croatia and Slovakia. *Environmental Geology* 2003;45:262-72.
77. Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact* 2010;188:289-300.
78. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases – a mechanistic approach. *Toxicol Lett* 2014;230:85-103.
79. Layé S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;82:295-303.
80. Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, van der Valk P, van Horsen J. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 2010;10:411-8.
81. Sarnataro D, Caputo A, Casanova P, Puri C, Paladino S, Tivodar SS et al. Lipid rafts and clathrin cooperate in the internalization of PrP in epithelial FRT cells. *PLoS One* [Internet]. 2009;4:e5829. [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005829>
82. Heidarsson PO, Naqvi MM, Otazo MR, Mossa A, Krage-lund BB, Cecconi C. Direct single-molecule observation of calcium-dependent misfolding in human neuronal calcium sensor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111: 13069-74.
83. Ozbayraktar FB, Ulgen KO. Molecular facets of sphingolipids: mediators of diseases. *Biotechnol J.* 2009;4: 1028-41.
84. Lee YJ, Wang S, Slone SR, Yacoubian TA, Witt SN. Defects in very long chain fatty acid synthesis enhance alpha-synuclein toxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS One* [Internet] 2011; 6:e15946. [cited 2015 Nov 2]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015946>.
85. Nair S, Traini M, Dawes IW, Perrone GG. Genome-wide analysis of *Saccharomyces cerevisiae* identifies cellular processes affecting intracellular aggregation of Alzheimer's amyloid-β42: importance of lipid homeostasis. *Mol Biol Cell* 2014;25:2235-49.
86. Vilaça R, Silva E, Nadais A, Teixeira V, Matmati N, Gai-fem J et al. Sphingolipid signalling mediates mitochondrial dysfunctions and reduced chronological lifespan in the yeast model of Niemann-Pick type C1. *Mol Microbiol* 2014;91:438-51.
87. Liu M, Huang C, Polu SR, Schneider R, Chang A. Regulation of sphingolipid synthesis through Orm1 and Orm2 in yeast. *J Cell Sci* 2012;125:2428-35.
88. Heedeok H. Role of lipids in folding, misfolding and function of integral membrane proteins *In: Gursky O (ed). Lipids in protein misfolding, Advances in Experimental Medicine and Biology. Switzerland: Springer International Publishing* 2015;1-31.