

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Janja ZAJC

**FIZIOLOŠKE PRILAGODITVE KSEROFILNIH  
GLIV IZ RODU *Wallemia* NA RAST PRI SLANIH  
POGOJIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Janja ZAJC

**FIZIOLOŠKE PRILAGODITVE KSEROFILNIH GLIV IZ RODU  
*Wallemia* NA RAST PRI SLANIH POGOJIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS OF XEROPHILIC FUNGI FROM  
GENUS *Wallemia* TO LIFE AT SALINE CONDITIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Na Kemijskem inštitutu v Ljubljani v Laboratoriju za biotehnologijo smo izdelali rastne krivulje. Proteomske analize so bile opravljene na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Meritve vsebnosti ionov so izvedli v Laboratoriju za agrikulturalno mikrobiologijo Oddelka za mikrobiologijo Univerze v Cordobi, Španija. Meritve vsebnosti kompatibilnih topljencev so opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in biotehnologijo Univerze Friedrich-Wilhelms v Bonnu, Nemčija. Masna spektroskopija proteinov je bila opravljena na Inštitutu Biozentrum Univerze v Baslu v Švici.

Komisija za študijske zadeve univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je dne 16.06.2006 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman in za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš ter dne 18.09.2008 za predsednico komisije prof.dr. Kristino Sepčić in somentorico dr. Tino Kogej.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina Sepčić

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina Gunde - Cimerman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ana Plemenitaš

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za Biokemijo

Članica: dr. Tina Kogej

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 20. 05. 2009

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polni vsebini na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani. Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Janja Zajc

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA****ŠD** Dn**UDK** 581.5:582.28(043.2)=163.6**KG** rod *Wallemia*, fiziološke prilagoditve, slanost, osmoliti, subproteomika**AV** ZAJC, Janja**SA** GUNDE CIMERMAN, Nina (mentor)/KOGEJ, Tina (somentor)/PLEMENITAŠ, Ana (recenzent)**KZ** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo**LI** 2009**IN** FIZIOLOŠKE PRILAGODITVE KSEROFILNIH GLIV IZ RODU *Wallemia* NA RAST PRI SLANIH POGOJIH**TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)**OP** XI, 106 str., 13 pregl., 30 sl., 66 vir.**IJ** sl**JI** sl/en**AI** Glive bazidiomicetnega rodu *Wallemia* so med najbolj ekstremofilnimi evkariontskimi organizmi, opisanimi doslej. Uspevajo v okoljih z nizko količino biološko dostopne vode (suha, sladka in slana hrana, zrak, prst, soline in slana jezera). Rod *Wallemia* vsebuje le tri vrste: *W. ichthyophaga*, *W. muriae* in *W. sebi*, ki so vse kserofilne in halofilne. Halofilni organizmi visoko slanost okolja kompenzirajo s kopiranjem visokih znotrajceličnih koncentracij osmolitov, bodisi kationov bodisi kompatibilnih topljencev. Poleg tega pa razvijejo tudi posebne prilagoditve na nivoju oblike celice in celične stene. Namen študije je bil identificirati in kvantificirati osmolite vseh treh vrst rodu *Wallemia* ter raziskati diferenčno izražanje proteinov celične stene pri slanih pogojih. Rastne krivulje smo določili s tehtanjem suhe biomase med rastjo pri zmerni in ekstremno visoki slanosti tekočega gojišča. Morfologijo celic in celičnih skupkov smo preučili s svetlobno mikroskopijo. Količino in tip kompatibilnih topljencev smo določili s HPLC, vsebnost  $K^+$  in  $Na^+$  pa z atomsko absorpcijsko spektroskopijo. Proteine celične stene *W. ichthyophaga* smo ločili z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in analizirali s tandemsko MS. Meritve vsebnosti osmolitov so pokazale, da vrste rodu *Wallemia* kopičijo glicerol, arabitol in manitol ter vzdržujejo relativno nizko vsebnost kationov pri pogojih visoke slanosti. Znotrajcelična vsebnost natrija je višja od kalija, kar je pri glivah nenavadno. Subproteomske analize proteinov celične stene *W. ichthyophaga* so pokazale, da se nekateri proteini, vključeni v metabolizem sladkorjev in celično morfogenezo, izražajo različno pri zmerni in pri ekstremno visoki slanosti. Naši rezultati potrujejo hipotezo, da je za ohranjanje celične integritete pri slanih pogojih pomembno kopiranje znotrajceličnih osmolitov. Nizke vsebnosti osmolitov so verjetno posledica rasti v obliki gostih skupkov, znotraj katerih so celice manj izpostavljene slanemu okolju.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn

UDC 581.5:582.28(043.2)=163.6

CX genus *Wallemia*, physiological adaptations, salinity, osmolytes, subproteomics

AU ZAJC, Janja

AA GUNDE CIMERMAN, Nina (supervisor)/KOGEJ, Tina (co-supervisor)/  
PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Vecna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2009

TI PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS OF XEROPHILIC FUNGI FROM GENUS  
*Wallemia* TO LIFE AT SALINE CONDITIONS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 106 p., 13 tab., 30 fig., 66 ref.

LA sl

AL sl/en

**AB** Fungi from basidiomycetous genus *Wallemia* are amongst the most extremophilic eukaryotes ever described. They thrive in environments with low amount of biologically available water (dry, sweet and salty food, air, soil, saltersns and salt lakes). Genus *Wallemia* contains only three species: *W. ichthyophaga*, *W. muriae* and *W. sebi*, which are all xerophilic and halophilic. Halophilic organisms counterbalance high environmental salinity by accumulating high intracellular amounts of osmolytes (either cations or compatible solutes). In addition, they also develop special adaptations on the level of the cell morphology or the cell wall. The objectives of the study of *W. ichthyophaga*, *W. muriae* and *W. sebi* were to identify and to quantify the osmolytes and to discover differentially expressed cell wall proteins, when grown at high salinity conditions. Growth curves of all three *Wallemia* spp. were constructed by measuring the dry biomass weight while culturing them at moderate and extremely high salinity in liquid growth media. Cell and cell cluster's morphology was examined by light microscopy. We determined amounts and types of compatible solutes by HPLC and amounts of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> by atomic absorption spectroscopy. Cell wall proteins of *W. ichthyophaga* were separated by two-dimension gel electrophoresis and analysed by tandem MS. Osmolyte measurements at moderate and high salinity conditions showed that *Wallemia* spp. accumulate glycerol, arabitol and mannitol while maintaining relatively low cation content at high salinity conditions. Surprisingly, the amounts of sodium are higher than the amounts of potassium, which is an unusual phenomenon for fungi. Subproteomic analysis of *W. ichthyophaga* cell wall proteins at moderate and extreme salinity showed differential expression of some proteins, involved in sugar metabolism and cell morphogenesis. Our results confirm the predictions that the accumulation of osmolytes is important for the preservation of the cell integrity in extreme saline environments. Low contents of osmolytes may be due to growth in dense clusters of cells, inside which cells are less exposed to saline media.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ .....	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 OPREDELITEV POJMOV .....	4
2.2 HIPERSLANA OKOLJA.....	5
2.3 BIOLOŠKA PESTROST HIPERSLANIH OKOLIJ .....	6
<b>2.3.1 Halofilne črne kvasovke .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Rod <i>Wallemia</i> .....</b>	<b>9</b>
2.3.2.1 Ekologija gliv rodu <i>Wallemia</i> .....	9
2.3.2.2 Filogenetska uvrstitev gliv rodu <i>Wallemia</i> .....	10
2.4 ŽIVLJENJE V SLANEM OKOLJU .....	14
2.5 FIZIOLOŠKE PRILAGODITVE NA SLANO OKOLJE .....	15
<b>2.5.1 Prilagoditev z znotrajceličnimi osmoliti .....</b>	<b>15</b>
2.5.1.1 Strategija kompatibilnih topljencev .....	17
2.5.1.2 Strategija vnosa soli v celico .....	21
2.5.1.3 Prilagoditev na povišano slanost z znotrajceličnimi osmoliti pri glivah	23
2.5.1.4 Prilagoditev gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na povišano slanost z znotrajceličnimi osmoliti .....	26
<b>2.5.2 Prilagoditev na nivoju membran .....</b>	<b>26</b>
2.5.2.1 Prilagoditev na nivoju membran pri glivah.....	27
2.6 MORFOLOŠKE PRILAGODITVE NA SLANO OKOLJE .....	28
<b>2.6.1 Prilagoditev na nivoju celične stene .....</b>	<b>28</b>
2.6.1.1 Prilagoditev na nivoju celične stene pri glivah .....	29
2.6.1.2 Prilagoditev na nivoju celične stene pri glivah rodu <i>Wallemia</i> .....	29
<b>2.6.2 Tvorba sklerocijev kot prilagoditev na stres.....</b>	<b>30</b>

2.7	SUBPROTEOMIKA CELIČNE STENE.....	30
<b>2.7.1</b>	<b>Zgradba celične stene in proteini celične stene pri glivah .....</b>	<b>30</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Proteomika gliv .....</b>	<b>32</b>
2.7.2.1	Subproteomika celične stene gliv.....	35
<b>3</b>	<b>METODE IN MATERIALI .....</b>	<b>36</b>
3.1	UPORABLJENE VRSTE GLIV .....	36
3.2	METODE DELA .....	36
<b>3.2.1</b>	<b>Submerzno gojenje gliv .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Izdelava rastnih krivulj za glice <i>Wallemia</i> spp. pri izbranih slanostih ....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Meritve velikosti celic in skupkov celic ter teže vzorcev .....</b>	<b>38</b>
3.2.3.1	Meritve velikosti celic .....	38
3.2.3.2	Meritve velikosti skupkov celic .....	38
3.2.3.3	Meritve mase vzorcev .....	39
<b>3.2.4</b>	<b>Meritve kompatibilnih topljencev.....</b>	<b>39</b>
3.2.4.1	Priprava vzorcev za meritve kompatibilnih topljencev .....	39
3.2.4.2	Določitev vrste in količine kompatibilnih topljencev s HPLC .....	41
<b>3.2.5</b>	<b>Meritve koncentracije ionov .....</b>	<b>41</b>
3.2.5.1	Priprava vzorcev za meritve koncentracije ionov .....	42
3.2.5.2	Določitev koncentracije ionov z AAS.....	45
<b>3.2.6</b>	<b>Preiskava proteoma celične stene in citosola <i>W. ichthyophaga</i> in <i>H. werneckii</i> z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo.....</b>	<b>46</b>
3.2.6.1	Priprava vzorcev proteinov .....	47
3.2.6.2	Dvodimenzionalna gelska elektroforeza proteinov <i>W. ichthyophaga</i> in <i>H. werneckii</i> .....	53
3.2.6.3	Metode detekcije proteinov na SDS-PAGE .....	57
3.2.6.4	Irezovanje proteinskih lis .....	59
3.2.6.5	Masna spektroskopija proteinov celične stene .....	59
3.3	GOJIŠČA, RAZTOPINE IN PUFRI.....	60
<b>3.3.1</b>	<b>Gojišča .....</b>	<b>60</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Raztopine in pufri.....</b>	<b>61</b>
3.3.2.1	Raztopine pri pripravi vzorcev za meritve vsebnosti ionov .....	61

3.3.2.2	Raztopine pri pripravi vzorcev za meritve vsebnosti kompatibilnih topljencev	62
3.3.2.3	Raztopine za izolacijo in analizo proteinov celične stene in citosola ....	64
3.4	KEMIKALIJE, PRIBOR IN APARATURE.....	70
<b>3.4.1</b>	<b>Kemikalije .....</b>	<b>70</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Laboratorijski pribor in material .....</b>	<b>71</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Laboratorijske aparature .....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>74</b>
4.1	RASTNE KRIVULJE GLIV RODU <i>Wallemia</i> .....	75
4.2	VELIKOSTI CELIC IN VELIKOSTI SKUPKOV GLIV RODU <i>Wallemia</i> .	76
<b>4.2.1</b>	<b>Velikosti in oblike celic.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Velikosti in oblike skupkov.....</b>	<b>78</b>
4.3	VSEBNOST KOMPATIBILNIH TOPLJENCEV V CELICAH GLIV RODU <i>Wallemia</i> .....	78
4.4	VSEBNOST KATIONOV V CELICAH GLIV RODU <i>Wallemia</i> .....	80
<b>4.4.1</b>	<b>Razmerje med znotrajceličnim <math>K^+</math> in <math>Na^+</math> pri vrstah rodu <i>Wallemia</i> .....</b>	<b>81</b>
4.5	PROTEOMIKA CELIČNE STENE <i>W. ichthyophaga</i> IN <i>H. werneckii</i> .....	82
<b>4.5.1</b>	<b>Izolirane koncentracije proteinov .....</b>	<b>82</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Ločitev proteinov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo.....</b>	<b>82</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Analiza proteinov celične stene <i>W. ichthyophaga</i> in <i>H. werneckii</i> .....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>86</b>
5.1	RAZPRAVA.....	86
<b>5.1.1</b>	<b>Oblika in velikost celic ter skupkov celic gliv rodu <i>Wallemia</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Rastne krivulje gliv rodu <i>Wallemia</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah gliv rodu <i>Wallemia</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Vsebnost kationov v celicah gliv rodu <i>Wallemia</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Proteomika celične stene <i>W. ichthyophaga</i> in <i>H. werneckii</i> .....</b>	<b>93</b>
5.2	SKLEPI.....	97
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>101</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Rast vrst iz rodu <i>Wallemia</i> na gojišču z različnimi vodnimi aktivnostmi z NaCl kot topljencem (Zalar et al., 2005: 321). ....	10
Slika 2: Filogenetsko drevo gliv glede na SSU rDNK (Zalar et al., 2005: 316). ....	11
Slika 3: Radialni dendrogram, ki temelji na ITS rDNK, kaže na sorodnost <i>W. sebi</i> in <i>W. muriae</i> in od njiju molekularno oddaljeno <i>W. ichthyophaga</i> (Zalar et al., 2005; 318). ....	12
Slika 4: Mikromorfologija vrst rodu <i>Wallemia</i> (Zalar et al., 2005: 320). ....	13
Slika 5: Model stabilizacije proteinov s kompatibilnimi topljenci (Roberts, 2005, str. 21). ....	19
Slika 6: Shematska zgradba celične stene gliv (Selitrennikoff, 2001, str. 2884). ....	31
Slika 7: Model molekularne zgradbe celične stene kvasovk s prikazanimi proteini (Smits et al., 2001, str. 782). ....	32
Slika 8: Rastna krivulja glive <i>W. sebi</i> v tekočem gojišču YNB s 5 % in 20 % (m/V) NaCl. ....	75
Slika 9: Rastna krivulja glive <i>W. muriae</i> v tekočem gojišču YNB s 5 % in 20 % (m/V) NaCl. ....	75
Slika 10: Rastna krivulja glive <i>W. ichthyophaga</i> v tekočem gojišču YNB s 15 % in 25 % (m/V) NaCl. ....	76
Slika 11: Primerjava rastnih krivulj gliv <i>Wallemia</i> spp. pri nizki in visoki slanosti tekočega gojišča YNB. ....	76
Slika 12: Mikroskopski posnetek <i>W. sebi</i> (YNB s 5 % NaCl, logaritemska faza rasti). ....	77
Slika 13: Mikroskopski posnetek <i>W. sebi</i> (YNB z 20 % NaCl, logaritemska faza rasti). ....	77
Slika 14: Mikroskopski posnetek <i>W. ichthyophaga</i> (YNB s 15 % NaCl, logaritemska faza rasti). ....	77
Slika 15: Mikroskopski posnetek <i>W. ichthyophaga</i> (YNB s 25 % NaCl, logaritemska faza rasti). ....	77
Slika 16: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah <i>W. sebi</i> , gojenih pri 5 % in 20 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB. ....	78
Slika 17: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah <i>W. muriae</i> gojenih pri 5 % in 20 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB. ....	79

Slika 19: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah vrst rodu <i>Wallemia</i> pri dveh izbranih slanostih.....	79
Slika 20: Celokupna vsebnost kationov v celicah <i>W. sebi</i> , gojenih pri 5 % in 20 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB.....	80
Slika 21: Celokupna vsebnost kationov v celicah <i>W. muriae</i> , gojenih pri 5 % in 20 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB.....	80
Slika 23: Celokupna vsebnost kationov v celicah vrst rodu <i>Wallemia</i> pri nižji in višji slanosti.....	80
Slika 24: Razmerje med znotrajcelično vsebnostjo K <sup>+</sup> in Na <sup>+</sup> pri vrstah rodu <i>Wallemia</i> pri dveh izbranih slanostih.....	81
Slika 25: Slika gela 2DEF proteinov celične stene <i>H. werneckii</i> pri 10 % NaCl v gojišču.	83
Slika 26: Slika gela 2DEF proteinov celične stene <i>H. werneckii</i> pri 25 % NaCl v gojišču.	83
Slika 27: Slika gela 2DEF proteinov celične stene <i>W. ichthyophaga</i> pri 15 % NaCl v gojišču.....	83
Slika 28: Slika gela 2DEF proteinov celične stene <i>W. ichthyophaga</i> pri 25 % NaCl v gojišču.....	83
Slika 29. Slika gela 2DEF proteinov celične stene <i>W. ichthyophaga</i> pri 25 % NaCl v gojišču z označenimi izrezanimi proteinskimi lisami.	84
Slika 30: Slika gela 2DEF proteinov celične stene <i>H. werneckii</i> pri 25 % NaCl v gojišču z označenimi izrezanimi proteinskimi lisami.	84

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam in oznake preiskovanih sevov iz mikrobiološke zbirke .....	36
Preglednica 2: Slanosti za gojenje vrst iz rodu <i>Wallemia</i> .....	37
Preglednica 3: Vsi poskusi 2DEF.....	53
Preglednica 4: Sestava SDS poliakrilamidnega gela.....	55
Preglednica 5: Izračunane koncentracije NaCl in sorbitola za preiskovane slanosti. ....	61
Preglednica 6: Sestava raztopin za spiranje celic pri pripravi vzorcev za meritve ionov ...	62
Preglednica 7: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla. ....	70
Preglednica 8: Seznam uporabljenih aparatur s proizvajalcem in državo porekla. ....	73
Preglednica 9: Rezultati merjenja dolžine in širine celic vrst rodu <i>Wallemia</i> pri dveh izbranih slanostih.....	77
Preglednica 10: Razmerje med intracelularnim K <sup>+</sup> in Na <sup>+</sup> pri vrstah rodu <i>Wallemia</i> pri dveh izbranih slanostih.....	81
Preglednica 11: Izolirane koncentracije proteinov celične stene in citosola vrste <i>W. ichthyophaga</i> in <i>H. werneckii</i> .....	82
Preglednica 12: Seznam analiziranih proteinov celične stene <i>W. ichthyophaga</i> .....	85
Preglednica 13: Seznam analiziranih proteinov celične stene <i>H. werneckii</i> . ....	85

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\mu\text{l}$	mikroliter ( $10^{-6}$ litra)
$\mu\text{m}$	mikrometer ( $10^{-6}$ metra)
2D	dvodimenzionalen
AAS	atomska <b>absorpcijska sprektroskopija</b>
ATP	adenozin trifosfat
cit. po	citirano po
$\text{dH}_2\text{O}$	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angleško <b>High Performance Liquid Chromatography</b> )
ITS	zaporedja, ki ločujejo rDNK različnih ribosomalnih podenot (angleško <b>Internal Spacer Regions</b> )
M	molarna koncentracija (mol/l)
m/V	razmerje med maso in prostornino
MilliQ	ultračista destilirana voda
MS	<b>masna spektroskopija</b>
PAGE	<b>poliakrilamidna gelska elektroforeza</b>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angleško <b>Polymerase Chain Reaction</b> )
rDNK	ribosomalna deoksiribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat (angleško <b>Sodium Dodecyl Sulphate</b> )
SSU	majhna podenota (angleško <b>Small Subunit</b> )

## 1 UVOD

Mikroorganizmi lahko, za razliko od višjih oblik življenja, poseljujejo določena okolja, ki so z antropocentričnega gledišča ekstremna/skrajnostna. Takšni ekstremi so polarne regije, vroči vrelci, globine oceanov, vrhovi gora, puščave, s kemikalijami onesnažena tla, kisle in bazične vode ter s soljo nasičene vode in drugi, ki se pojavljajo po vsej Zemeljski obli. Slanost kot glaven okoljski parameter zasluži pozornost mikrobiologov in biotehnologov, saj imajo zaščitni mehanizmi tolerance na slanost široko komercialno uporabnost (Andreishcheva, 1999).

Mikrobiologija ekstremofilov (to je organizmov, ki uspevajo v ekstremnih okoljih) je bila sprva osredotočena na prokariontske mikroorganizme, in sicer zaradi prepričanja, da evkariontski organizmi niso zmožni življenja v ekstremnih pogojih. Novejše raziskave so razkrile veliko biološko pestrost evkariontskih organizmov v ekstremnih okoljih, med katerimi so glive ekološko najuspešnejše (Gunde-Cimerman et al., 2005).

Osmotski stres, ki nastane zaradi visoke koncentracije soli ali neionskih topljencev v obdajajočem mediju, je za življenje omejujoč dejavnik. Zaradi obilja morske vode na Zemlji in vedenja, da življenje izvira prav iz morja, ni presenetljivo, da se je zgodba o osmotskih prilagoditvah osredotočila na halofilne in halotolerantne organizme (Kushner, 1978; Larsen 1986; Oren, 1994, cit. po Galinski, 1995). Najbolje raziskani evkariontski ekstremofili so halofilne in halotolerantne glive, ki poseljujejo hiperslane vode slanih jezer in solin po svetu (Gunde-Cimerman et al., 2004, 2005).

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Skupina raziskovalcev (Zalar et al., 2005) katedre za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti je opisala nov red gliv *Wallemiales* in v njegovem okviru rod *Wallemia* s tremi vrstami (*W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*), od katerih sta slednji dve novi za znanost. Glive tega rodu so po naravi kserofilne, *W. ichthyophaga* pa je najbolj

halofilni evkariontski organizem opisan doslej, saj za rast potrebuje minimalno 10 % NaCl v gojišču. V naravi se vse tri vrste pojavljajo v okoljih z nizko vodno aktivnostjo oziroma visoko slanostjo, na primer v izjemno slanih vodah solin. Rod *Wallemia* je zanimiv tudi s filogenetskega stališča, saj predstavlja staro, ločeno linijo znotraj debla *Basidiomycota*, med katerimi tako rekoč ni opisanih kserofilnih gliv in je komajda nekaj kserotolerantnih (Zalar et al., 2005).

Halofilni organizmi uporabljajo dve osnovni strategiji prilagoditve na visoko slanost v zunanjem okolju:

- i) »KCl strategijo«, za katero je značilno vzdrževanje podobne znotrajcelične koncentracije soli (KCl), kot je v zunanjem okolju, ali
- ii) »strategijo organskih osmolitov«, pri kateri osmotski tlak medija uravnajo s kopičenjem organskih kompatibilnih topljencev.

Pri prvi vnašajo ione v celico do nivoja izenačitve turgorja in osmotskega tlaka, pri drugi strategiji pa osmotski tlak v celici izravnavajo s sintezo kompatibilnih topljencev (Oren, 1999).

## 1.2 CILJ

Cilj diplomske naloge je ugotoviti, katero strategijo osmoadaptacije pri pogojih visoke slanosti imajo *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Ker so bile tri vrste gliv rodu *Wallemia* opisane šele pred nedavnim, njihovi mehanizmi prilagajanja na visoko slanost še niso znani.

Poleg tega pa smo žeeli pregledati še izražanje proteinov celične stene in citosola pri nizki in visoki slanosti pri *W. ichthyophaga* v primerjavi z vrsto *Hortaea werneckii*, ki je modelni halofilni evkariont.

## 1.3 DELOVNA HIPOTEZA

1. Predvidevamo, da se glive iz rodu *Wallemia*, ki uspevajo pri širokem razponu koncentracij NaCl v gojišču, prilagajajo na povišano slanost v okolju s kopičenjem ionov ali kompatibilnih topljencev. Vnos ionov v celico do nivoja izenačitve turgorskega in osmotskega tlaka je

značilen predvsem za prokariontske ekstremne halofile iz domene arhej in za nekatere bakterije. Med evkariontskimi organizmi to strategijo do neke mere uporablja le kvasovka *Debaryomyces hansenii*. Čeprav predvidevamo, da glice iz rodu *Wallemia* sintetizirajo kompatibilne topljence, najverjetneje glicerol, obstaja zaradi filogenetsko ločene pozicije (Zalar et al., 2005) tudi možnost, da uporabljajo strategijo vnosa ionov.

2. Strategija osmoadaptacije naj bi se pokazala tudi s proteomsko analizo proteinov citosola in celične stene. Predvidevali smo, da bomo pri višji slanosti našli proteine, vključene v sintezo kompatibilnih topljencev. Glede na to, da so celična stena in vanjo vključeni proteini v direktnem stiku s slanim okoljem, predvidevamo, da bodo imeli pri višji slanosti proteini več negativnih nabojev.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPREDELITEV POJMOV

Organizme, ki uspevajo pri povišanih koncentracijah soli, glede na rastni optimum razvrščamo kot halofilne (rahlo, srednje ali ekstremno halofilne), halotolerantne in morske. **Halofilni organizmi** za rast potrebujejo sol in imajo optimalno rast pri znatno višji koncentraciji soli, kot jo ima morska voda. **Halotolerantni mikroorganizmi** za rast ne potrebujejo soli, vendar jo v rastnem mediju tolerirajo do neke meje, ki je v veliki meri odvisna od sestave samega rastnega medija (Galinski, Trüper, 1994).

Sol v rastnem mediju zmanjšuje količino biološko dostopne vode, zato so slana okolja za organizme tako rekoč suha. Organizmom, prilagojenim na rast pri znižanih vodnih aktivnostih, ne glede na topljenec v rastnem mediju, pravimo **kserofili**. Večina gliv, ki rastejo na slanih substratih, kaže splošen kserofilni fenotip, obstajajo pa tudi prave halofilne glive. Glive so kserofilne, če dobro rastejo pri vodnih aktivnostih 0,85 ali manj, kar ustreza 17 % (m/V) NaCl ali 50 % (m/V) glukoze v rastnem mediju. Po novejši definiciji halofilnosti pri glivah so halofilne tiste vrste, ki jih redno in v visokem številu izoliramo iz okolja na selektivnih medijih s slanostjo nad 10 % in so sposobne rasti *in vitro* na gojišču z najmanj 17 % NaCl (Gunde-Cimerman et al., 2004, 2005).

Galinski in Trüper (1994) predlagata razlikovanje med organizmi, ki tolerirajo sol zaradi notranjih zaščitnih mehanizmov ter organizmi, ki kažejo »pridobljeno« halotoleranco zaradi kopiranja zaščitnih snovi iz okolja.

Termin »osmoadaptacija« ima širok pomen in zajema tako fiziološke kot genetske manifestacije prilagoditev na pomanjkanje vode v okolju. Izraz »osmoregulacija« je bolj primeren za opis takojšnjih regulatornih odzivov, ki vključujejo aktivnost senzorjev ali prožilcev, ki preoblikujejo okoljske spremembe v fiziološke signale (Galinski, 1995).

## 2.2 HIPERSLANA OKOLJA

Hiperslana okolja so tista okolja, ki imajo koncentracijo soli višjo od morske vode, to je več kot 3,5 % (m/V) NaCl (Microbial Life, Extreme Environments, 2007). Pogosta so širom sveta, najpogostejša pa so v vročih in suhih predelih. Koncentrirane raztopine soli najdemo v naravnih ekosistemih, kot so morski bazeni in slana močvirja, slana in alkalna jezera ter v umetnih ekosistemih, kot so soline (Galinski, Trüper, 1994) ali s soljo konzervirana živila.

Slana jezera se lahko po ionski sestavi močno razlikujejo med seboj, saj je le-ta močno odvisna od okoliške topografije, geologije in splošnih klimatskih razmer. Hiperslane vode glede na izvor delimo na dva tipa, atalasohaline in talasohaline. Za oba tipa je značilen bolj ali manj nevtralen pH. Atalasohaline so tiste slane vode, na katerih ionsko sestavo vpliva geološka podlaga, zato zanje niso značilne visoke vsebnosti kloridnih in natrijevih ionov (Galinski, Trüper, 1994). Primera takšnega tipa okolja sta Veliko slano jezero ter Mrtvo morje. Slednje ima vodno aktivnost 0,50 (Krumgalz et al., 2000) in je s slanostjo  $340 \text{ g l}^{-1}$  eno izmed najbolj slanih jezer na Zemlji. Talasohalina voda je zaradi evaporacije koncentrirana morska voda, v kateri prevladujeta iona natrij in klorid (Oren et al., 2002). Primer talasohaline vode so sončne soline, kakršne so tudi Sečoveljske soline na slovenskem delu Jadranske obale. Glavna značilnost solinskih bazenov je naraščanje slanosti od 3 % do 35 % NaCl, torej do nasičene raztopine soli, zaradi izhlapevanja morske vode, nizka koncentracija kisika, visoka intenziteta svetlobe, zadostna dostopnost hraničnih in nevtralni pH. Morska voda postopoma izhlapeva v zaporednih evaporativnih bazenih.

Alkalna jezera so tudi tip hiperslanih okolij, kjer visoko koncentracijo soli spremlja še povišan pH zaradi vsebnosti karbonatnih mineralov v okoliških kamninah. Vrednosti pH so lahko tudi zelo visoke, med 10 in 12. V takih razmerah sta odsotna  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ , saj v zelo bazičnem okolju precipitirata iz raztopine. Evaporacija povzroči koncentriranje naravno prisotnih bazičnih soli.

Hiperslane habitate predstavljajo tudi površine s soljo ali kisom konzerviranih živil ter fermentirani produkti orientalske kuhinje (sojina omaka) (Galinski, Trüper, 1994). Sol odvzame vlago, torej zniža vodno aktivnost, kar onemogoča rast številnim bakterijam in glivam, ki bi živilo hitro pokvarile. Največkrat se s soljo konzervira mesne izdelke in ribe. Posamezni izdelki se po vodni aktivnosti razlikujejo v odvisnosti od količine dodane soli ter stopnje osušenosti mesa.

Slana okolja za razvoj halofilnih in/ali halotolerantnih mikroorganizmov predstavlja tudi koža ljudi in živali, površine puščavskega grmičevja, ki izloča sol, in druge površine v aridnem podnebju, ki so izpostavljene periodičnemu sušenju (Galinski, Trüper, 1994).

Poleg novodobnih hiperslanih makroekosistemov so v preteklosti hiperslane vode pokrivale velike površine v različnih delih sveta. Na to kažejo depoziti kamene soli v Evropi in Severni Ameriki. Tako je jasno, da evolucija halofilnih in halotolerantnih oblik življenja poteka že dolgo časa (Galinski, Trüper, 1994).

### 2.3 BIOLOŠKA PESTROST HIPERSLANSIH OKOLIJ

Ekstremna okolja navdušujejo mikrobiologe od odkritja mikroorganizmov, ki uspevajo v nišah, za katere so pred tem mislili, da so abiotske (Gunde-Cimerman et al, 2005). Mikrobeno življenje je moč najti v vsem razponu koncentracij soli, od sladke vode, morskih biotopov do hiperslanih okolij, kjer koncentracija NaCl dosega nasičenje.

Halofilni in halotolerantni mikroorganizmi so v vseh treh domenah življenja: *Archaea*, *Bacteria* in *Eucarya*. Kolonizacija hiperslanih okolij je tako uspešna, da populacije halofilnih ali halotolerantnih mikroorganizmov dosegajo visoke gostote (Oren, 1999).

Sprva so se zaradi prepričanja, da evkariontski organizmi niso zmožni življenja v ekstremnih pogojih, osredotočili na raziskave prokariontskih mikroorganizmov (Gunde-Cimerman et al., 2005). Galinski in Trüper (1994) v spektru mikrobnih vrst slanih biotopov evkariontskih predstavnikov, razen alge *Dunaliella*, ne omenjata. Novejše študije so razkrile veliko biološko raznolikost evkariontskih organizmov v ekstremnih habitatih, med katerimi so glive ekološko najuspešnejše (Gunde-Cimerman et al., 2005). Skupina raziskovalcev je iz hiperslane vode Sečoveljskih solin izolirala številne vrste gliv, ki jih umetno uvrščamo v skupino črnih kvasovk. Ugotovili so, da je hiperslana voda naravna ekološka niša za halofilne črne kvasovke (Gunde-Cimerman et al., 2000).

V naravnih okoljih z ekstremnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi prevladujejo arheje in bakterije, a so v njih tudi evkariontski mikroorganizmi, med njimi »črne kvasovke« ozziroma mikrokolonijske glive ozziroma meristematske askomicete, izredno uspešni. Znane so že od konca 19. stoletja (de Hoog et al., 1999). Težavna morfologija, počasna rast in slaba kompetitivna sposobnost je pogosto omejevala izolacijo in identifikacijo teh gliv (Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006).

### **2.3.1 Halofilne črne kvasovke**

Melanizirane glive ekstremnih habitatov so vsaj del življenja ali v kvasni ali v meristematski obliki (de Hoog et al., 1999). Skupina halotolerantnih črnih kvasovk je polifiletska (Sterflinger et al., 1999), a večino predstavnikov uvrščamo v red *Dothideales* (de Hoog et al., 1999). Za črne kvasovke so značilne melanizirane in počasi rastoče kolonije ter razmnoževanje z izodiametričnimi podaljški delečih se celic. Njihove značilne lastnosti so: polimorfizem (so v kvasni, filamentozni in meristematski obliku), meristematska rast in endokonidiacija ali sarcinska konidiogeneza. Pogoste so muriformne celice, ki se razvijejo s konverzijo nediferenciranih hif, ter debela, melanizirana celična stena (Zalar et al., 1999; Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006).

V Sečoveljskih solinah so s štirimi različnimi metodami izolacije in več selekcijskimi gojišči za halofile in kserofile našli številne (osmotolerantne in prave halofilne) vrste gliv, ki jih lahko razdelimo na dve skupini. Prva skupina so nehalofilne nemelanizirane glice, izolirane večinoma na gojiščih s sladkorjem (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. in ostale), za katere je najverjetnejše, da so bile v solinsko vodo zanesene iz okoljne prsti ali dna solinskega bazena ter se v slani vodi najverjetnejše ne morejo razmnoževati (Gunde-Cimerman et al., 2000). Druga skupina pa so skoraj izljučno melanizirane, halotolerantne in halofilne glice, ki so jih izolirali na gojiščih z dodano soljo. Melanizirane glice so pripadale vrstam: *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum* in *Aureobasidium pullulans*. Vsi taksoni pripadajo redu askomicet, to je redu *Dothideales*. Njihova naravna ekološka niša je hiperslana voda solin (Gunde-Cimerman et al., 2000).

*H. werneckii* (*Dothideales*, *Ascomycota*) je melanizirana, kvasovkam podobna vrsta gliv, ki jo uvrščamo v arbitrarno skupino tako imenovanih črnih kvasovk. Gre za ekstremno halotolerantno ali celo halofilno vrsto (Petrovič et al., 1999; Gunde-Cimerman et al., 2000). Njena naravna ekološka niša so hiperslane vode solinskih bazenov, kjer se je pokazala kot prevladujoča glivna vrsta med celotno sezono pridelave soli (Gunde-Cimerman et al., 2000). Izoliramo pa jo lahko, kot opisujejo mnogi avtorji, iz morske vode, soljenih rib ter človeške kože, kjer povzroča kozmetično nevšečnost, imenovano *tinea nigra* (Zalar et al., 1999). *H. werneckii* raste v celotnem območju koncentracij soli, od 0 % NaCl do nasičenja raztopine (32 % NaCl) tako v solinskih bazenih kot v *in vitro* laboratorijskih razmerah (Gunde-Cimerman et al., 2000; Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006). *H. werneckii* je najbolje opisan evkariontski halofilni organizem in je ena izmed najbolj halotolerantnih vrst med vsemi mikroorganizmi. Zato je zelo primerna kot modelni organizem za študije tolerance na sol pri evkariontih (Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006).

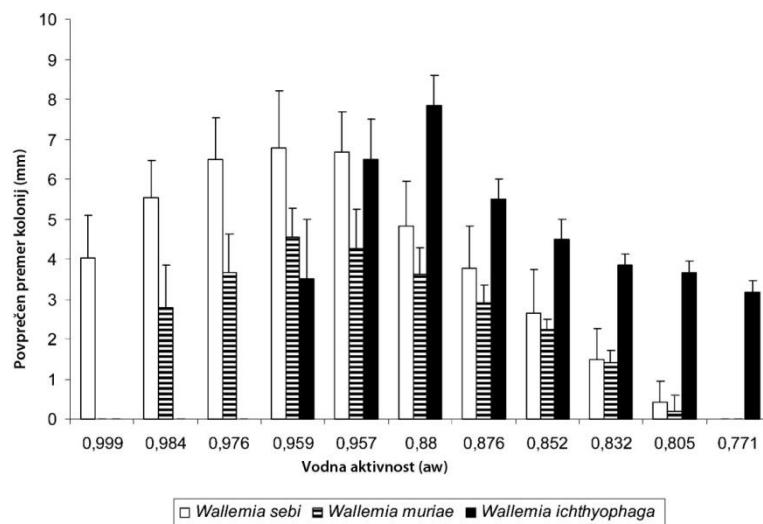
*A. pullulans* je kozmopolitska halotolerantna vrsta iz redu *Dothideales*, ki tolerira do 17 % soli v rastnem mediju. Na višjih koncentracijah soli ali sladkorja ne uspeva (Gunde-Cimerman et al., 2000). *P. triangularis* je obligatorno halofilna vrsta (Zalar et al., 1999) z ozko ekološko

amplitudo. Najvišjo frekvenco pojavnosti v solinskih vodah ima v območju med 22 % do 28 % NaCl ter je nezmožna rasti pri 32 % soli (Gunde-Cimerman et al., 2000). *P. triangularis* je najpogosteje izolirana iz mikrobnih biofilmov na površini hiperslanih vod in iz mikrobnih o dej (Butinar et al., 2005). Za vrsto *T. salinum* je značilna meristematska rast. Prvič so vrsto opisali Zalar s sodelavci (1999a), in sicer izolat iz hiperslane vode slovenskih solin. *T. salinum* raste v in na potopljenem lesu v solinskih bazenih (Butinar et al., 2005). *Debaryomyces hansenii* je kriotolerantna morska kvasovka, ki lahko tolerira do 24 % NaCl. Sposobna je rasti pri nizki temperaturi in v slanem okolju. Prisotna je v mlekarnah, slanih in arktičnih vodah. Kontaminira produkte z nizko vodno aktivnostjo (Prista, 1997).

### 2.3.2 Rod *Wallemia*

#### 2.3.2.1 Ekologija gliv rodu *Wallemia*

*Wallemia* Johan-Olsen je kozmopolitski rod kserofilnih bazidiomicetnih gliv, ki so pogosto vzrok za pokvarjeno hrano. Obsega tri vrste: *W. ichthyophaga*, *W. sebi* in *W. muriae*. Vrste lahko izoliramo iz sladke (sadje, marmelade, torte, sladkor), slane (ribe, meso, arašidi) in posušene hrane ter morske soli, prsti in zraka. Sprva je bil rod *Wallemia* opisan kot halofilen, kasneje pa kot kserofil, saj je bila rast na umetnih gojiščih neodvisna od uporabljenega topljenca za znižanje vodne aktivnosti. Kserotoleranca je pri bazidiomicetah relativno redka (Zalar et al., 2005). Testi kserotolerance so pokazali, da rod *Wallemia* predstavlja enega najbolj kserofilnih taksonov gliv. Med njimi je najbolj kserofilna vrsta *W. ichthyophaga*. Raste v gojišču z znižano vodno aktivnostjo z najmanj 10 % (m/V) NaCl, kar ustreza vodni aktivnosti 0,959, pa vse do nasičenosti s soljo (32 % NaCl ozziroma vodna aktivnost 0,771). Med vsemi do sedaj opisanimi evkariontskimi organizmi je vrsta *W. ichthyophaga* tudi najbolj halofilna. *W. muriae* raste pri vodnih aktivnostih od 0,984 do 0,805. *W. sebi* je edina predstavnica rodu, ki raste tudi na substratih brez znižane vodne aktivnosti. Povprečen premer kolonij z označeno standardno deviacijo meritev glede na vodno aktivnost trdnega gojišča prikazuje slika 1 (Zalar et al., 2005).

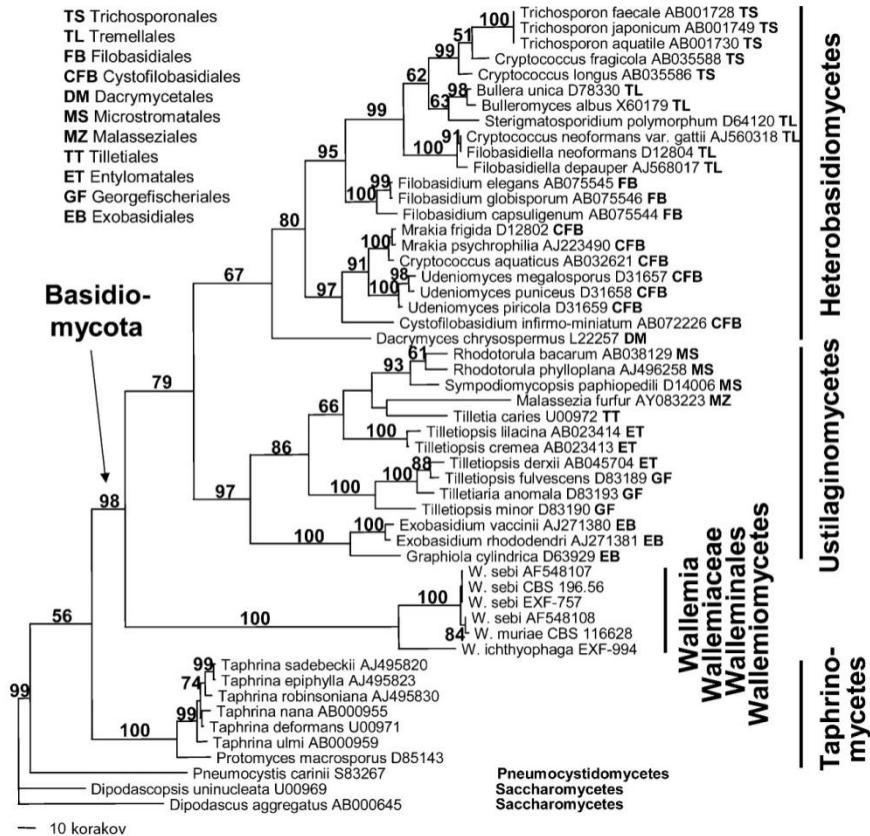


Slika 1: Rast vrst iz rodu *Wallemia* na gojišču z različnimi vodnimi aktivnostmi z NaCl kot topljencem (Zalar et al., 2005: 321).

Določeni sevi vrst *Wallemia* lahko proizvajajo toksine valeminol in valeminon ter povzročajo subkutane infekcije pri ljudeh, verjetno pa so tudi odgovorni za alergološke težave, ki se odražajo v bolezni kmetovih pljuč. Wood s sodelavci (1990) je pokazal, da ima izolat *W. sebi* toksične učinke. Izolirali so valeminol A in ga okarakterizirali kot triciklični dihidroksiseskviterpen, katerega minimalna inhibitorna doza (50 µg/ml) je primerljiva z mikotoksinoma, kot sta penicilinska kislina in citrinin.

### 2.3.2.2 Filogenetska uvrstitev gliv rodu *Wallemia*

Po filogenetski primerjavi sekvenč vrst *Wallemia* z drugimi glivami v zraku (večinoma askomicetami in zigomicetami) (Wu et al., 2003), je dobil rod *Wallemia* izolirano in nerazrešeno pozicijo. Filogenijo, taksonomijo in tudi ekologijo rodu *Wallemia* je študirala Zalar s sodelavci (2005) in izolirane seve primerjala z različnimi referenčnimi sevi. Višji filogenetski rangi so bili izpeljani iz analize skupine genov SSU rDNK (slika 2), določitev vrst pa je potekala s študijo sekvenčnih podatkov ribosomalne DNK (slika3) (5.8S rDNK in ITS), morfoloških in fizioloških značilnosti (Zalar et al., 2005).



Slika 2: Filogenetsko drevo gliv glede na SSU rDNK (Zalar et al., 2005: 316).

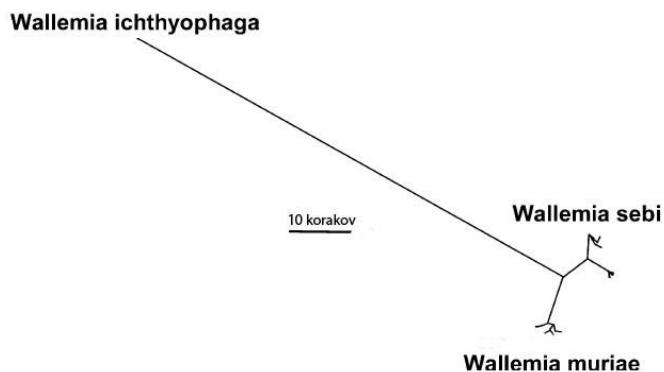
Po analizah majhne jedrne podenote ribosomalne DNK (SSU rDNA) je *Wallemia* uvrščena v vejo skupaj z *Ustilaginomycetes* in *Hymenomycetes* (*Basidiomycota*). V tej veji zavzema ločeno pozicijo, daljno sorodno s *Filobasidiales* (slika 2). *Ustilaginomycetes* in *Hymenomycetes* imata izolirano filogenetsko mesto med bazidiomicetami in vsebuje tudi takson s kvasovkam podobnimi anamorfi in biotrofnimi življenjskimi slogi. Ti dve pojavnosti sta značilni za filogenetsko stare oblike življenja. Rod *Wallemia* je relativno soroden takšnim oblikam življenja, zato naj bi bil filogenetsko starodaven takson (Zalar et al., 2005).

Da je *Wallemia* bazidiomicetna linija, je pokazal tudi Matheny s sodelavci (2006) z analizo drugih genov. Preučili so filogenetsko pozicijo *Walleiomycetes* z uporabo nukleotidnih značilnosti 18S, 25S in 5.8S genov ribosomalne RNK in z analizo aminokislinskih mest

genov, ki kodirajo jedrne proteine. Ugotovili so, da je *Wallemiomycetes* zgodnja linija znotraj Basidiomycota, kjer zavzema osnovno pozicijo blizu Entorrhizomycetidae (Matheny et al., 2006).

Rod *Wallemia* karakterizirajo številne nukleotidne substitucije v SSU rDNK in SSU rDNK, ki jih pri drugih glivnih taksonih ne najdemo. Te so se verjetno nakopičile med dolgotrajno evolucijo ali pa obstajajo zaradi izumrtja bližnjih sorodnikov rodu *Wallemia*, kar ponovno namiguje na filogenetsko starodavnost rodu (Zalar et al., 2005).

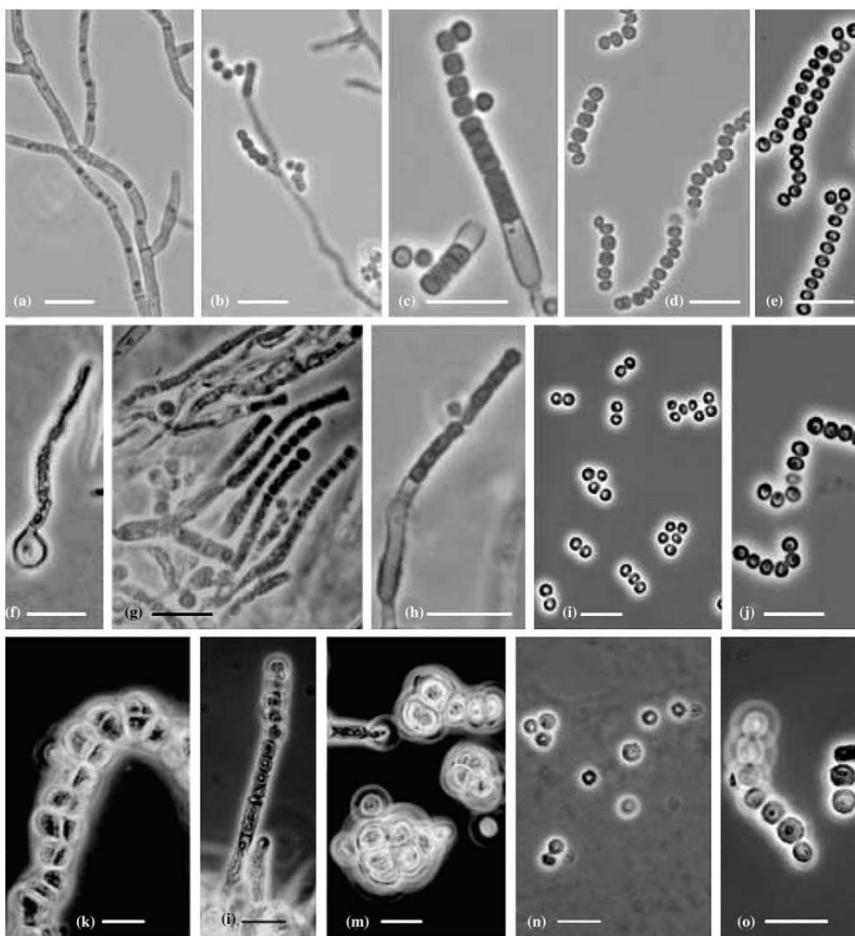
Med vrstami znotraj rodu so velike molekularne razdalje med analiziranimi zaporedji rDNK. Zaporedja *W. ichthyophaga* se ne pokrivajo dobro z zaporedji *W. sebi* in *W. muriae*. *W. ichthyophaga* se razlikuje od ostalih dveh vrst po številnih nukleotidih SSU in ITS rDNK (slika 3).



Slika 3: Radialni dendrogram, ki temelji na ITS rDNK, kaže na sorodnost *W. sebi* in *W. muriae* in od njiju molekularno oddaljeno *W. ichthyophaga* (Zalar et al., 2005; 318).

Kljud molekularnim razlikam pa je sorodnost vrst rodu *Wallemia* podkrepljena z morfološkimi značilnostmi. Pri vseh treh vrstah se iz morfološko podobnih konidioforov tvorijo artrosporam podobni konidiji v enotah po 4. Morfologija konidioforov in bazoavksalni tip konidiogeneze sta edinstvena v kraljestvu gliv. Morfologijo vseh treh vrst prikazuje slika 4. Molekularna odmaknjenost *W. ichthyophaga* ne preseneča, saj se tudi morfološko razlikuje od ostalih dveh,

med seboj zelo podobnih, vrst. Le *W. ichthyophaga* tvori sarcinam podobne strukture (Zalar et al., 2005).



Slika 4: Mikromorfologija vrst rodu *Wallemia* (Zalar et al., 2005: 320). (a–e) *Wallemia sebi*, MY50G. (a) Hife (CBS 196.56); (b) simpodialno podaljšanje konidiofor (CBS 196.56); (c) konidiogene celice tvorijo po štiri konidije skupaj (MZKI B-953); (d, e) konidiji v verigah (MZKI B-384 in CBS 196.56); (f–j) *Wallemia muriae*, MY50G. (f) Germinacija odebelenega konidija v hifo (EXF-753); (g, h) konidiogene celice tvorijo konidije (CBS 110624; EXF-755); (i) konidiji (CBS 411.77); (j) konidiji v verigah (k–o) *Wallemia ichthyophaga*, MY50G. (k) muriformne hife (EXF-759); (l) konidiogene celice tvorijo konidije EXF1059), (m) sarcinam podobne strukture celic (EXF-994); (n) posamezni konidiji (EXF-759); (o) konidiji v verigah (EXF-759). Merilna skala na mikrografijah predstavlja 10µm.

Glede na edinstveno morfologijo, evolucijo in kserotoleranco je Zalar s sodelavci (2005) predlagala nov basidiomicetni razred *Wallemiomycetes* z redom *Wallemiales*. Glede na razlike v velikosti konidijev, kserotoleranco in razlike v ITS rDNK je razlikovala vsaj tri vrste rodu *Wallemia*; *W. ichthyophaga*, *W. sebi* in *Torula epizoa var. muriae*, za katero je predlagano ime *W. muriae*. Vse tri vrste so neotipizirane.

## 2.4 ŽIVLJENJE V SLANEM OKOLJU

Kemijski in fizikalni dejavniki v okolju v veliki meri vplivajo na rast, aktivnost in naravno razporeditev mikroorganizmov. Med njimi so še posebej pomembni temperatura, pH, kisik in biološko dostopna voda .

Mikrobi, izpostavljeni slanemu okolju, se spopadajo s številnimi stresnimi faktorji, kot je na primer ionska jakost, ionska sestava ter osmotski stres (Galinski, Trüper, 1994). Kadar so v okolju organizma prisotne visoke koncentracije soli, nastane poleg osmotskega stresa še stres zaradi toksičnosti specifičnih ionov (Prista et al., 1997). Osmotski stres, ki nastane zaradi pomanjkanja vode oziroma ga povzroča visoka koncentracija soli ali neionskih topljencev v obdajajočem mediju, je za življenje omejujoč dejavnik. Zaradi obilja morske vode na Zemlji in vedenja, da življenje izvira prav iz morja, ni presenetljivo, da se je zgodba o osmotskih prilagoditvah osredotočila na halofilne in halotolerantne organizme (Kusher, 1978; Larsen 1986; Oren, 1994, cit. po Galinski, 1995).

Dostopnost vode za biokemijske reakcije organizmov največkrat opišemo z izrazom vodna aktivnost ( $a_w$ ) (Blomberg in Adler, 1992). Vodna aktivnost je razmerje med parnim tlakom vode nad raztopino in parnim tlakom čiste vode pri isti temperaturi. Vrednosti vodne aktivnosti se gibljejo med 0 in 1 (čista voda).

Celice morajo ustrezeno prilagajati svoje notranje okolje, tako da celični procesi nemoteno potekajo, celica pa lahko preživi in raste (Blomberg in Adler, 1992). Okolje z visoko koncentracijo topljenca ima nizko vodno aktivnost. Vodne molekule v raztopini so v povezavi s topljencem, kar povzroči spremembo v stanju vode. Topljenec namreč dramatično zniža količino za žive organizme dostopne vode (Blomberg in Adler, 1992). Citoplazmatska membrana je prosto prepustna za vodo, zato velike koncentracije topljenca v okolju povzročijo njeno izhajanje iz celice (dehidracijo) ter izgubo turgorja in ustavitev rasti, razen če ima organizem sposobnost prilagoditve na pomanjkanje vode v okolju (Galinski, 1995). Vzpostavitev pozitivnega turgorskega tlaka, ki zagotavlja mehansko silo za ekspanzijo celične stene med rastjo, je glavni problem, povezan z rastjo organizmov pri slanih pogojih (Larsson, 1990). Vsak mikroorganizem, ki živi pri visokih koncentracijah soli, mora obdržati svojo citoplazmo vsaj izoosmotsko glede na zunanje okolje, zato da ne izgublja vode. Izgradnja turgorskega tlaka zahteva hiperosmotsko citoplazmo (Oren, 1999). Sinteza oziroma kopičenje osmotsko aktivnih snovi v celici povzroči padec znotrajceličnega vodnega potenciala, ki ga spremlja vdor vode in posledično povišanje turgorskega tlaka.

Rast v slanem okolju zahteva specifične fiziološke in morfološke adaptacije celice na različnih nivojih. Strategije prilagajanja na življenje v slanem okolju vključujejo kopičenje ali/in sintezo znotrajceličnih osmolitov, bodisi organskih kompatibilnih topljencev bodisi anorganskih kationov, ter prilagoditve na nivoju strukture celične stene in/ali celične membrane.

## 2.5 FIZIOLOŠKE PRILAGODITVE NA SLANO OKOLJE

### 2.5.1 Prilagoditev z znotrajceličnimi osmoliti

V mikrobnem svetu obstajata dve glavni strategiji, ki mikroorganizmom omogočata kljubovanje osmotskemu stresu, nastalemu zaradi prisotnosti visokih koncentracij soli v okolju.

Galinski in Trüper (1994) sta strategiji osmoadaptacije oziroma ohranjanja osmotskega ravnotežja preko membrane opredelila kot:

- i. strategijo vnosa soli (ali »salt-in«) oziroma kot halobakterijski ali »KCl« tip osmoadaptacije in
- ii. strategijo kompatibilnih topljencev oziroma organsko-osmolitski tip osmoadaptacije.

Pri prvi strategiji celica vzdržujejo visoko znotrajcelično koncentracijo soli, ki je osmotsko najmanj ekvivalentna koncentraciji v zunanjosti (strategija vnosa soli). Vsi znotrajcelični sistemi morajo biti prilagojeni na prisotnost visoke koncentracije soli. Pri drugi strategiji ni potrebe po posebnih adaptacijah znotrajceličnega sistema. Celice vzdržujejo nizko koncentracijo soli v citoplazmi, osmotski tlak medija je uravnotežen z organskimi kompatibilnimi topljenci v citoplazmi (Oren, 1999).

Razlika med skupinama je jasno vidna iz slanostnega odziva citoplazemskih encimov, ki so prilagojeni na višjo slanost, oziroma se hitro inaktivirajo z naraščanjem slanosti (Galinski, 1995).

Stres zaradi prisotnosti visoke koncentracije soli lahko razložimo z dveh različnih vidikov; prvi vidik je, kot je opisano zgoraj, povezan z osmotskimi težavami, drugi pa temelji na toksičnosti specifičnih ionov (Prista et al., 1997). Natrij je v naravi zelo razširjen kation in je za večino celic toksičen že v nizkih koncentracijah (Kogej et al., 2005). Predlagani mehanizem za razlago toksičnosti  $\text{Na}^+$  ionov pri *S. cerevisiae* je kompetitivna inhibicija privzema  $\text{K}^+$ , ki vodi k izplenu  $\text{K}^+$  v celici in k povišanemu nivoju  $\text{Na}^+$ . Pekovska kvasovka, *S. cerevisiae*, nima specifičnega sistema za privzem natrija, le-ta prehaja skozi membrano s kalijevimi transportnimi sistemi, ki imajo večjo afiniteto do kalija kot do natrija, zato se prvi prednostno kopiči. Pokazali so, da  $\text{Na}^+$  lahko delno nadomesti  $\text{K}^+$ , vendar se ta fenomen odvija le v zelo ozkem območju koncentracij  $\text{Na}^+$ .  $\text{Na}^+$  postane toksičen, ko je razmerje  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  od 0,7 do 1 (Prista et al., 1997).

### 2.5.1.1 Strategija kompatibilnih topljencev

Pri večini halofilnih in halotolerantnih mikroorganizmov je osmotsko ravnotežje doseženo z majhnimi organskimi molekulami, ki so bodisi produkt lastne sinteze bodisi so privzete iz obdajajočega medija (Oren, 1999).

Kompatibilni topljenci so topljenci, ki pri visokih (molarnih) koncentracijah, omogočajo učinkovito delovanje celičnih encimov. Tipično so nizkomolekularne komponente, ki so vodotopne tudi pri visokih koncentracijah. So nenabite ali pa so v obliki ionov dvojčkov pri fiziološkem pH (Oren, 1999). Njihova akumulacija sodeluje pri pomembnih elementih celičnega razmnoževanja, kot so vzdrževanje turgorskega tlaka, celične prostornine in koncentracije elektrolitov. Ključen dogodek, ki sproži kopiranje osmolitov, je zaznavanje razlik v zunaj- in znotrajcelični koncentraciji soli, spremembi celične prostornine in/ali turgorskega tlaka. Zaznavanje vključuje ionske kanalčke ali druge transmembranske proteine (Roberts, 2005).

Znotrajcelične koncentracije organskih osmotskih topljencev se uravnavajo glede na slanost zunanjega medija. Strategija uporabe organskih kompatibilnih topljencev zato omogoča visoko stopnjo prilagajanja celic na spremembe v koncentraciji soli v okolju (Oren, 1999). Prednost organskih osmolitov pred kopiranjem kationov je torej v bolj fleksibilni adaptaciji preko širokega razpona slanosti, saj se v celici ohranijo »normalni«, na sol občutljivi, encimi (Galinski in Trüper, 1994) oziroma ni potrebe po posebnih adaptiranih proteinih.

Strukturno kompatibilni topljenci nimajo veliko skupnega. Obstaja široka paleta tipov teh organskih molekul, ki so jih našli tako v halofilnih, kot tudi v halotolerantnih mikroorganizmih. Seznam poznanih kompatibilnih topljencev stalno narašča (Oren, 1999). Njihovo pestrost se odkriva s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in jedrsko magnetno resonanco (NMR) (Galinski, 1993).

Kompatibilni topljenci so polioli in njihovi derivati, sladkorji in derivati le-teh, amino kisline in derivati, občasno tudi (ustrezno spremenjeni) peptidi ter betaini in ektoini (Roberts, 2005). Med polioli sta najpogostejsa glicerol in arabitol, med sladkorji saharoza in trehaloza, med aminokislinami pa prolin (Galinski, Trüper, 1994). Poliole pogosto najdemo pri algah, kvasovkah in glivah, pri bakterijah jih do sedaj še niso našli. Sladkorji so navadno del »koktajla« topljencev pri različnih organizmih (Galinski, 1993).

Pri glivah so najbolj razširjeni polioli, med njimi so najpogostejsi glicerol, treitol, eritritol, ribitol, arabitol, ksilitol, sorbitol, manitol in galaktitol. Večina glivnih vrst proizvaja glicerol in arabitol, nekatere med njimi tudi manjše količine eritritola (Galinski in Trüper, 1994). Vsi glivni taksoni pripadajo bodisi skupini, ki proizvaja različne poliole razen manitola (Zygomycota in Saccharomycetales), bodisi skupini, ki med drugimi polioli proizvaja tudi manitol (Chytridiomycota, Ascomycota, Basidiomycota in Deuteromycotina) (Blomberg in Adler, 1992).

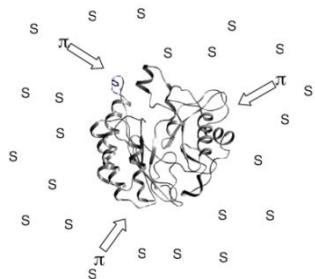
Preračunani ekvivalenti molekul ATP, ki se porabijo za sintezo posameznih vrst kompatibilnih topljencev, pokažejo, zakaj je glicerol tako razširjen med organizmi. Vrstni red, začenši z energetsko najugodnejšim topljencem, je naslednji: glicerol, ektoin, glicin betain, glukozil glicerol in saharoza in trehaloza (Oren, 1999). Glicerol je z enostavno kemijsko zgradbo in najnižjim ATP zahtevkom pri sintezi energetsko najugodnejši kompatibilni topljenec (Oren, 1999). Njegova kemijska struktura je 1,2,3-propantriol. Med vsemi naštetimi je tudi najbolje topen v vodi, tudi v molarnih koncentracijah. Poleg tega pa odlično ohranja aktivnost znotrajceličnih encimov. Omejen je le na domeno evkariontov (Oren, 1999).

Kompatibilni topljenci imajo širok spekter uporabe. Odgovorni so za osmotsko ravnotežje in so istočasno kompatibilni s celičnim metabolizmom (Galinski in Trüper, 1994), kažejo pa tudi veliko učinkovitost pri stabilizaciji makromolekul pred škodljivimi učinki visoke koncentracije soli in pred drugimi stresnimi dejavniki (Oren, 1999). Zato ni presenetljivo, da

je raziskovanje njihove pojavnosti, pestrosti in vpliva na makromolekule tako množično. Večina raziskav je usmerjenih v odnose do proteinov in do nukleinskih kislin.

Kompatibilni topljenci povišajo stabilnost proteinov in delujejo kot kemijski šaperoni v celici. Predstavljajo zaščito ne le pred slanostnim stresom, temveč tudi pred visokimi temperaturami, zmrzovanjem in izsuševanjem (Galinski in Trüper, 1994). Termostabilizacijska vloga osmolitov se izkorišča za različne biotehnološke namene (Roberts, 2005).

Teorije o interakciji proteinov in topljencev klasificiramo v dva tipa. Prvi tip so teorije, ki postulirajo direktno interakcijo med topljencem in makromolekulo; drugi tip pa tiste, ki predvidevajo stabilnost makromolekul zaradi s topljencem izzvanih sprememb v strukturi vode (Roberts, 2005). Interakcije med vodo in proteinom so ključne za samo strukturo in biološko funkcijo proteinov (Mattos, 2002). Osmoliti v visokih koncentracijah tekmujejo z vodnimi molekulami za interakcijo s površino proteina. Organski topljenci so preferenčno izločeni s površine proteina, kar vodi k prednostni hidrataciji proteina (slika 5). Povišan osmotski tlak spodbuja kompaktno zvite proteine, ki izpostavlja manj površine kot denaturirani in imajo manj vodnih molekul v svoji notranjosti (Arakawa in Timasheff, 1985; Yancey, 2001; Roberts, 2005).



Slika 5: Model stabilizacije proteinov s kompatibilnimi topljenci (Roberts, 2005, str. 21).

Skupna lastnost kompatibilnih topljencev je povišanje denaturacijske temperature (Blomberg, Adler, 1992). Arakawa in Timasheff (1985) sta eksperimentalno pokazala, da dodatek osmolitov poviša termično stabilnost lizocima, pri čemer sta se glicin in L-serin izkazala kot

najuspešnejša. Ugotovila sta tudi, da osmoliti nimajo opaznega vpliva na strukturo proteina in da so izločeni iz proteinske domene. Z gostotnimi meritvami je bilo pokazano, da je glicerol izločen iz bližnje hidratacijske sfere proteina v raztopini proteina in glicerola. Ta lastnost zmanjšuje interakcije med proteinom in topljencem, kar je v skladu z opazovanji (povezovanje podenot, stabilizacija proti denaturaciji). Splošni mehanizem, s katerim kompatibilni topljenci stabilizirajo proteine, je preferenčna hidratacija in hkratna izločitev topljenca iz neposredne bližine proteina (Blomberg, Adler, 1992). Tako med proteini in kompatibilnimi topljenci ni direktnega stika.

Vpliv kompatibilnih topljencev na nukleinske kisline in komplekse nukleinskih kislin s proteini je poznan predvsem zaradi izboljševanja donosa in specifičnosti verižne reakcije s polimerazo (PCR). Kompatibilni topljenci vplivajo na stabilizacijo nukleinskih kislin, izboljšajo tvorbo kompleksov med nukleinskimi kislinami in proteini, izboljšajo čiščenje in modulirajo delovanje restriktičnih encimov (Kurz, 2008).

Postavitev modela za razlogo interakcij med kompatibilnimi topljenci in nukleinskimi kislinami je težavna naloga, saj so le-te mnogo bolj komplekse kot interakcije med topljenci in proteini. Upoštevati moramo množico vplivov, kot so direktne interakcije topljencev z bazami nukleinskih kislin, z negativnimi naboji fosfatne hrbtenice, interakcije s pozitivno nabitimi ioni in posredne interakcije prek sprememb v lastnostih topila (Kurz, 2008). Poleg tega pa se nukleinske kisline nahajajo v mnogih oblikah (enojna (RNK), dvojna veriga (DNK), celo trojne ali četverne verige), kar zelo poviša pestrost možnih vplivov organskih topljencev (Roberts, 2005).

### 2.5.1.2 Strategija vnosa soli v celico

Mehanizem vnosa soli, ki je bil odkrit pri predstavnikih družine *Halobacteriaceae* iz domene arhej, doseže osmotsko ravnotežje z vzdrževanjem podobne citoplazemske koncentracije soli, kot je v zunanjem okolju (Galinski in Trüper, 1994). Predstavniki so filogenetsko nesorodne aerobne ekstremno halofilne arheje (domena *Archaea*) reda *Halobacteriales* in anaerobne halofilne bakterije redu *Haloanaerobiales* (Oren, 1999).

Ionska sestava citoplazme se v splošnem močno razlikuje od ionske sestave okolja. Slednje v večini primerov vsebuje NaCl kot glavno sol, v celici pa so (molarne) koncentracije KCl (Oren, 1999).

Vnos soli zahteva precej fizioloških sprememb, kot so na slanost prilagojeni encimi in celične komponente, ki ščitijo regulatorne in metabolne funkcije celice pri visokih slanostih (Galinski in Trüper, 1994). Na slanost prilagojeni encimi so pravilo tako pri aerobnih arhejah kot pri anaerobnih bakterijah redu *Haloanaerobiales*. Celični proteini kažejo specifične molekularne prilagoditve, kot so prisotnost velikih količin kislih aminokislin ter majhne količine hidrofobnih aminokislin (Oren, 1999). Najbolj opazna značilnost ne le halofilnih encimov, temveč tudi kofaktorjev, ribosomov in posledično cele celice, je 10-14 % (mol/mol) dodatni negativni naboj. Dobro preučena malat dehidrogenaza iz *Halobacterium marismortui* ima 20 % (mol/mol) več kislih kot bazičnih aminokislinskih ostankov v primerjavi s 6 % (mol/mol) pri nehalofilmem encimu (Galinski, 1995).

Organizmi s strategijo kopičenja KCl na splošno kažejo relativno ozko prilagoditev na specifično okolje (Galinski in Trüper, 1994). Večina proteinov halofilnih arhej je odvisnih od visokih koncentracij soli, saj le-ta sodeluje pri ohranjanju ustrezne konformacije in aktivnosti. Ti mikroorganizmi so zato vezani na okolja s stalno prisotnostjo visokih koncentracij soli (Oren, 1999). Tipično okolje halobakterij vsebuje širok razpon koncentracij soli, od 3 M pa do nasičenja s soljo. Kljub tako visokim koncentracijam soli v okolju vzdržujejo halobakterije

citoplazmo relativno prosto natrija ( $\text{Na}^+$ ) in kopijo velike količine kalija ( $\text{K}^+$ ). Tako stanje dosežejo s sistemom za privzem kalija v sodelovanju z učinkovitim sistemom za izločanje natrija. Proses vodi protonski gradient, kar pomeni, da se del protonske gibalne sile (za sintezo ATP) porabi za vzdrževanje kalijevega gradiента v razmerju 100:1 (3 M koncentracija  $\text{K}^+$  v notranjosti proti 0,03 M  $\text{K}^+$  v zunanjosti celice). Ta energetski strošek ni izgubljen, saj delno vodi privzem natrijevega glutamata ali omogoča energijsko oskrbo (sintezo ATP) tudi v odsotnosti svetlobe ali substratov za oksidacijo (Galinski, 1995).

Interakcije med proteini in visoko vsebnostjo soli v okolju so še vedno slabo razumljene. Obširne raziskave so razkrile, da nativna halofilna malat dehidrogenaza veže izjemno veliko vode in soli (0,8 - 1,0 g vode in približno 0,3 g soli/g proteina v primerjavi 0,2 - 0,3 g vode in približno 0,01 g soli/g proteina nehalofilnega proteina). Voda in ioni soli na protein niso vezani posebej, temveč kot hidratirani ioni. Tertiarna in kvartarna struktura encima je pomembna za ustvarjanje višje lokalne koncentracije hidratiranih ionov, kot je v topilu. Še neizpopolnjen model za halofilno malat dehidrogenazo predlaga naslednjo strukturo proteina: jedro proteina je podobno nehalofilnem encimu, iz jedra štrleče zanke z anionskimi aminokislinskimi ostanki pa interagirajo z vodo in predstavljajo veliko stično površino s topljencem. Odstranitev kationov (manj kot 0,5 M) oslabi konformacijo proteina zaradi odbojev med izpostavljenimi negativnimi naboji na površini makromolekule. To trditev podpira tudi dejstvo, da znižanje pH vrednosti učinkovito poviša encimsko aktivnost in stabilnost pri nizkih koncentracijah soli (Galinski, 1995).

Končni učinek soli je stabilizacija strukture v smislu ojačanja zvite konformacije in hidrofobnih interakcij. Zanimivo je, da se stabilizacijski učinek kalijeve soli vsaj delno doseže tudi z dodatkom sladkorjev, glicerola in drugih kompatibilnih topljencev (Galinski, 1995).

Pri eubakterijah je glavni citoplazemski topljenec  $\text{NaCl}$  in ne  $\text{KCl}$ , kot je značilno za halobakterije. Glede na to, da glicin betain v gojišču v nekaterih primerih stimulira rast

organizmov, vsaj delna akumulacija kompatibilnih topljencev še ne more biti izključena (Galinski, 1995).

### 2.5.1.3 Prilagoditev na povišano slanost z znotrajceličnimi osmoliti pri glivah

Industrijsko zanimiva kvasovka *S. cerevisiae* je primeren modelni sistem za študije molekularne biologije in fiziologije osmoadaptacije mezofilnih mikroorganizmov, saj zanje obstajajo številna eksperimentalna orodja in je komercialno zanimiva. Osmoregulacijo so študirali tudi na drugih kvasovkah, kot so za človeka patogena *Candida albicans*, osmofilna *Zygosaccharomyces rouxii*, ki povzroča kvarjenje hrane, in morska kvasovka *Debaryomyces hansenii*, ki je zanimiva zaradi svoje nenavadne tolerance do natrija (Hohmann, 2002). Odkritja velike biološke pestrosti gliv v hiperslanih okoljih (Gunde-Cimerman et al., 2000) so sprožile potrebo po novih halofilnih modelnih organizmih. Dandanes je črna kvasovka, *Hortaea werneckii*, najbolje opisan evkariontski halofil, poleg tega pa je dominantna vrsta v hiperslanih vodah, zato je primeren model za študije osmoadaptacije halofilnih gliv (Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006). S fiziološkimi in molekularnimi prilagoditvami črnih kvasovk so se ukvarjali številni raziskovalci.

Gustafsson in Norkrans sta leta 1976 ugotovila, da kvasovka *D. hansenii* tvori glicerol kot glavni kompatibilni topljenec, ki prispeva k osmotskemu ravnotežju celic. Določala sta znotrajcelično, zunajcelično in tudi celokupno koncentracijo glicerola pri različnih slanostih gojišča. Producija glicerola je naraščala s slanostjo kulture in ni bila proporcionalna s tvorbo biomase. Koncentracija znotrajceličnega glicerola, ki je izrazito naraščala s slanostjo v kulturi, je dosegla najvišjo (molarno) koncentracijo v logaritemski fazi rasti.

Larsson je leta 1990 s sodelavci pokazal direktno povezavo med znotrajcelično koncentracijo vseh poliolov in slanostjo rastnega medija za celice *D. hansenii*. Pri višji slanosti je bila

vsebnost poliolov višja. Odkrili so dve vrsti poliolov, glicerol in arabitol. Nivo arabitola se je s slanostjo le malo spremenjal, zato so ga smatrali za konstitutivni kompatibilni topljenec. Po drugi strani pa se je glicerol obnašal kot inducibilni kompatibilni topljenec, katerega nivo se je višal s slanostnim stresom.

K sposobnosti rasti *D. hansenii* pri visokih slanostih veliko doprinaša tudi zmožnost izločanja  $\text{Na}^+$  in privzema  $\text{K}^+$ . Pomembno vlogo v vzdrževanju ravnotežnega nivoja znotrajceličnih kationov imajo proteini Ena (P-tip ATPaze). Zanje so pokazali, da mutanti *S. cerevisiae*, ki je občutljiva na  $\text{Na}^+$ , povrnejo toleranco na slanost in sposobnost izmeta  $\text{Na}^+$  ionov (Almagro et al., 2001). Larsson sodelavci (1990) je izmeril nenavadno visoke koncentracije kationov v celicah *D. hansenii*. Prista sodelavci (1997) ugotavlja tudi, da pri *D. hansenii*  $\text{Na}^+$  ioni nimajo specifične toksičnosti, povzročajo le osmotski efekt. *D. hansenii* je bolj tolerantna na  $\text{Na}^+$  ione (pa tudi na  $\text{Li}^+$  ione) kot *S. cerevisiae*. Kogej sodelavci (2005) je pri *D. hansenii* izmerila očitno višje koncentracije natrijevih ionov v celicah kot pri *H. werneckii* in *A. pullulans*.

Hernández-Saavedra sodelavci (1995) se je ukvarjal z osmotskimi prilagoditvami morskih kvasovk in je za vrste *A. pullulans*, *Candida* sp., *Cryptococcus albidus* var. *albidus*, *D. hansenii*, *Rhodotorula rubra* pokazal, da je najpomembnejši učinek povišane slanosti akumulacija glicerola v celicah. V večini primerov znotrajcelična koncentracija glicerola korelira s koncentracijo soli v zunanjem mediju.

V solinskih bazenih poleg slanostnega stresa simultano nastopa tudi temperaturni stres. Akumulacijo topljencev pri pogojih slanostnega in toplotnega stresa sta pri glivi *A. pullulans* raziskovala Managbanag in Torzilli (2002), ki sta ugotovila, da se v stresnih pogojih koncentracije trehaloze, manitola in glicerola v celici povišajo. Povišanje znotrajceličnega glicerola sta pripisala izključno slanostnemu stresu.

Meritve znotrajceličnih koncentracij kationov pri črni kvasovki *H. werneckii* so pokazale, da se vsebnosti K<sup>+</sup> in Na<sup>+</sup> spreminja glede na koncentracijo NaCl v rastnem mediju. Ko je *H. werneckii* rastla v gojišču brez soli, je vsebovala relativno velike količine kalija in zelo malo natrija. Z naraščajočo koncentracijo soli v rastnem mediju je količina K<sup>+</sup> v celici padala, vsebnost Na<sup>+</sup> pa naraščala do končne vrednosti, ki je bila višja od začetne vrednosti kalija. Zanimivo se je ta trend porušil pri 17 % NaCl, kjer sta oba iona dosegla minimalne vrednosti. Razmerje med kalijem in natrijem je bilo najvišje pri celicah, ki so rastle v gojišču brez soli, nato pa je padalo z naraščanjem slanosti. Podobno se je izkazalo za halotolerantno *A. pullulans*. Halotolerantna gliva *D. hansenii* je pri vseh slanostnih pogojih vsebovala višje količine natrija kot *H. werneckii* in *A. pullulans* (Kogej et al., 2005).

Prve meritve znotrajcelične koncentracije glicerola pri *H. werneckii* so pokazale, da le-ta narašča, ko kvasovka raste pri slanosti od 0 % do 10 %, pri višjih slanostih pa ostaja nespremenjena. Zunajcelična koncentracija glicerola je bila nizka do 17 % NaCl v gojišču, nato pa je naraščala. Predvidoma sintetizirani glicerol ostaja v celicah, čeprav možnost njegovega izhajanja in privzemanja v celice ni izključena (Petrovič et al., 2002).

*H. werneckii* poleg glicerola kopiči še druge višje poliole glede na slanost v rastnem mediju (Kogej 2006). Glavni osmolit v aktivno rastočih celicah je glicerol, katerega vsebnost se v stacionarni fazi zmanjša in ga delno zamenja eritritol. Celice pri slanostih do 10 % vsebujejo tudi arabitol in manitol, v stacionarni fazi pa tudi potencialni osmolit mikosporin-glutaminol-glukozid, ki je bil do sedaj znan le kot UV zaščitna snov. Aktivno rastoče celice z blokirano sintezo melanina so vsebovale manj glicerola in več eritritola, arabitola in manitola kot normalno melanizirane celice. Izguba glicerola iz nemelaniziranih celic bi lahko kazala na vlogo melanizirane celične stene pri zadrževanju visokih znotrajceličnih koncentracij glicerola. Mešanica osmolitov in melanizacija celične stene skupaj omogočata, da *H. werneckii* v svojem naravnem okolju lahko preživi pri širokem razponu koncentracij NaCl (Kogej 2006).

### 2.5.1.4 Prilagoditev gliv iz rodu *Wallemia* na povišano slanost z znotrajceličnimi osmolitimi

Ker so bile tri vrste gliv rodu *Wallemia* opisane šele pred nedavnim, raziskave o znotrajcelični vsebnosti kompatibilnih topljencev ali ionov na glivah rodu *Wallemia* še niso bile izvedene.

Preliminarne raziskave so pokazale, da vse tri vrste rodu *Wallemia* v okoljih z znižano vodno aktivnostjo izločajo aktivni metabolit s hemolitičnim delovanjem. Vrsta *W. sebi* izloča 32-krat več aktivnega metabolita, če raste v okolju z znižano vodno aktivnostjo. Predvidevajo, da omenjeni pojav predstavlja enega od mehanizmov fiziološke prilagoditve na rast v ekstremnih pogojih (Kralj Kunčič, 2008).

### 2.5.2 Prilagoditev na nivoju membran

Primarno bariero med celico in njenim okoljem predstavlja celična membrana, zato ima prilagodljivost membrane izjemen pomen za preživetje celice. Celica mora biti sposobna modificirati lipidno sestavo in posledično lastnosti membrane ob spremembah pogojev v okolju (Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006).

Za normalno delovanje membranskih funkcij je potrebno vzdrževati fluidnost membrane znotraj določenih meja. V vzdrževanje ustrezne fluidnosti membrane so vključeni številni faktorji: tip maščobnih acilnih verig (njihova dolžina, razvejanje in nenasičenost), količina sterolov in tudi narava polarnih fosfolipidnih glav. Kako fluidna je membrana pri določeni temperaturi, je odvisno predvsem od narave ogljikovodikovih repov fosfolipidov, ki sestavljajo membranski dvosloj. Krajsi kot so repi, večja je fluidnost, saj je na ta način zmanjšana tendenca interakcije ogljikovodikov verig. Vsaka dvojna vez namreč povzroči rahel zlom v ogljikovodikovi verigi repa, kar otežkoči njihovo tesno zlaganje drug ob drugega. Membrana je zato bolj fluidna. Membranska fluidnost se uravnava tudi z vključevanjem

sterolov v fosfolipidni dvosloj. Steroli zaradi svoje rigidne narave zmanjšujejo fluidnost lipidnega dvosloja.

### 2.5.2.1 Prilagoditev na nivoju membran pri glivah

Bakterijske in kvasne celice, ki se morajo prilagajati spremenjajočim se pogojem okolja, nenehno spremenjajo tako dolžino kot nenasičenost ogljikovodikovih repov, da ohranjajo relativno stalno fluidnost membrane. V slanem okolju ima fluidnost oziroma z njo povezana prepustnost membrane za osmotske topljence velik pomen. Bolj urejen lipidni membranski dvosloj ima manjšo fluidnost in s tem tudi manjšo prepustnost za poliole.

Večina bioloških membran glicerol dobro prepušča. Za zadrževanje glicerola morajo biti zato membrane posebno prilagojene, kar je razlog omejenosti uporabe glicerola na domeno evkariontov (Oren, 1999). Prepustnost za glicerol se zmanjša z zmanjšanjem števila dvojnih vezi v repih maščobnih kislin in s podaljšanjem maščobnokislinskih verig fosfolipidov (Turk, 2004). Membrana alge *Dunaliella* je zelo slabo prepustna za glicerol, prepustnost za vodo pa je nespremenjena. Za majhno prepustnost glicerola naj bi bili odgovorni steroli v membrani (Oren, 1999).

Določenim vrstam gliv, izoliranih iz solin, so pod pogoji slanostnega stresa okarakterizirali membrano; njihovo lipidno sestavo in fluidnost. Šlo je za študijo sterolov in fosfolipidov v povezavi s fluidnostjo membrane pri halofilnih kvasovkah podobnih melaniziranih glivah vrste *H. werneckii*, *P. triangularis* in halotolerantne vrste *A. pullulans*, katerih rezultate so primerjali z modelnim sevom *S. cerevisiae*. Te vrste halofilnih melaniziranih gliv se obnašajo drugače kot *S. cerevisiae*. Na slanost so se odzvale s spremembno različnih razredov lipidov, vendar je pri vseh vrstah sterolno-fosfolipidno razmerje in posledično fluidnost membrane koreliralo z njihovo ekofiziologijo in sposobnostjo uspevanja v ekstremnih slanih okoljih.

*H. werneckii* vzdržuje visoko fluidnost plazemske membrane preko širokega razpona koncentracij NaCl, kar kaže na visoko intrinzično (notranjo) halotoleranco. Membranska fluidnost sorodne halotolerantne črne kvasovke *A. pullulans* je bolj podobna na sol občutljivi *S. cerevisiae* kot halofilni *H. werneckii* (Turk et al., 2004). Plazemska membrana morske kvasovke *D. hansenii* se prilagodi na visoko slanost z znižanjem fluidnosti, povečanjem sterolno-fosfolipidnega razmerja in nenasicienosti maščobnih kislin. Sterolno-fosfolipidno razmerje je bilo v vseh pogojih gojenja podobno, kot je bilo ugotovljeno za ostale halofilne/halotolerantne črne kvasovke, vendar znatno manjše kot je bilo opaženo pri *S. cerevisiae*, na slanost občutljivi kvasovki (Turk et al., 2007).

Visoke koncentracije soli spremenijo lipidni vzorec membrane, kar vpliva na njeno fluidnost. Torej lahko določeno lipidno sestavo membrane povežemo s halotoleranco organizma. Membranska fluidnost je dober pokazatelj/indikator tolerance na sol v okolju (Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006).

## 2.6 MORFOLOŠKE PRILAGODITVE NA SLANO OKOLJE

### 2.6.1 Prilagoditev na nivoju celične stene

Glivne celice so obdane s celično steno, to je glavnim organelom, ki celici omogoča vzdrževanje notranjega turgorskega tlaka in nudi zaščito pred mehanskimi poškodbami (Yin et al., 2005). Celična stena gliv je zelo raznolika, kot je pestra tudi pojavnost gliv (kvasna, hifna oblika, spore in druge reproduktivne strukture). Oblika in integriteta celic je odvisna od mehanske jakosti celične stene, ki igra mnogo vlog med interakcijo glice z njenim okoljem (Gooday, 1995).

### 2.6.1.1 Prilagoditev na nivoju celične stene pri glivah

Hiperosmotski šok pri *S. cerevisiae* povzroči reorganizacijo celične stene in citoskeleta. Spremembe v organizaciji celične stene najverjetneje nastanejo kot rezultat prenestitve materiala periplazmatskega in stenskega matriksa v invaginacije plazemske membrane. Elektronska mikroskopija celic pod osmotskim stresom je razkrila globoke invaginacije plazemske membrane, ki so s periplazmatske strani zapolnjene z amorfnim materialom celične stene (Slaninova et al., 2000).

Pri *H. werneckii*, gojeni pri visoki slanosti, so bile opažene spremembe v strukturi celične stene, ki jih pri nižjih slanostih ni bilo. Poleg omenjenih invaginacij celične stene so se pojavile tudi spremembe v prerezporeditvi melanina, ki daje glivi temno barvo (Kogej, 2006). *H. werneckii* proizvaja 1,8-dihidroksinaftalen (DHN) melanin, katerega biosinteza ni pogojena s slanostjo (Kogej et al., 2004). Pri višji slanosti so granule melanina v zunanjem delu celične stene tesneje organizirane kot pri nižji slanosti (Kogej, 2006). Poleg znane vloge melanina pri zaščiti pred UV sevanjem, temperturnimi ekstremi in izsuševanjem razumemo prisotnost melanina v celični steni *H. werneckii* tudi kot vrsto osmotske zaščite.

### 2.6.1.2 Prilagoditev na nivoju celične stene pri glivah rodu *Wallemia*

S presevno elektronsko mikroskopijo ter vrstično elektronsko mikroskopijo s fokusiranim ionskim žarkom so primerjali debele in strukturo celične stene gliv *Wallemia* spp. v odvisnosti od rasti v slanih in sladkih gojiščih z različno vodno aktivnostjo. Ugotovili so, da se celične stene odebelpajo in postanejo bolj strukturirane v slanem gojišču. To potrjuje predvidevanja o pomembni vlogi celične stene, ki z odebelitvijo ohranja celično integriteto in posledično zagotavlja preživetje v okoljih z nizko vodno aktivnostjo (Kralj Kunčič, 2008).

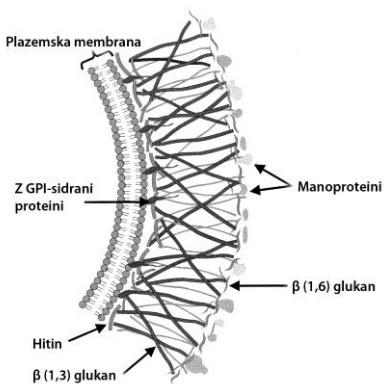
## 2.6.2 Tvorba sklerocijev kot prilagoditev na stres

Sklerocij pri glivah predstavlja močno zgoščene hife, kot prilagoditev na neugodne razmere. V notranjosti so zaloge hrane. Nekrotične in apoptotične celice tvorijo skorjo sklerocija, v notranjosti pa so vegetativne celice. Skorja je melanizirana in nepropustna za kisik. Hiperoksidativno stanje celice, ko količina kisikovih prostih radikalov preseže nevtralizacijsko sposobnost celice, sproži diferenciacijo evkariontskih celic. Oblikovanje sklerocijev pri filamentoznih glivah inducira oksidativni stres (Georgiou, 2006).

## 2.7 SUBPROTEOMIKA CELIČNE STENE

### 2.7.1 Zgradba celične stene in proteini celične stene pri glivah

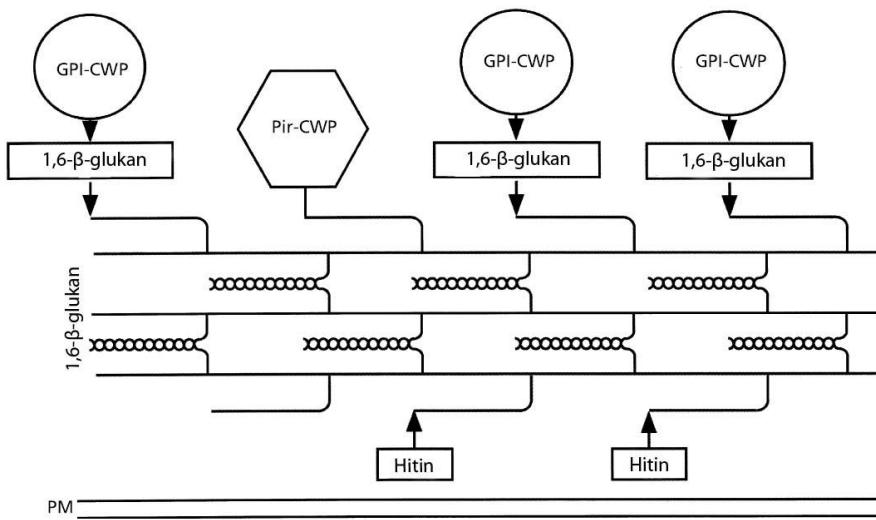
Glivna celična stena je kompleksna struktura, tipično zgrajena iz hitina, razvezanih verig  $\beta$ -1,3- in  $\beta$ -1,6-glukana, manana in proteinov, kot prikazuje slika 6. Med posameznimi komponentami so prečne povezave (Cabib et al., 2001; Klis et al., 2002). Sestava celične stene se vrstno spreminja (Adams, 2004). Elektronska mikroskopija je pokazala, da je celična stena *S. cerevisiae* dvoplastna struktura. Notranja skeletna plast je elektronsko prosojna in je sestavljena iz tridimenzionalne mreže razvezanih  $\beta$ -1,3-glukanskih molekul in kovalentno pripetih  $\beta$ -1,3-glukanskih in hitinskih molekul. Zunanji fibrilarni sloj je elektronsko gost in večinoma zgrajen iz manoproteinov, ki so kovalentno povezani z glikani celične stene (Yin et al., 2005). Dokazano je, da je molekularna zgradba celične stene podobna tudi pri drugih askomicetnih glivah. Ker imajo bazidiomicetne glive tudi dvoslojno organizacijo celične stene, je zelo verjetno, da je njena molekularna zgradba podobna kot pri *S. cerevisiae* (Yin et al., 2008).



Slika 6: Shematska zgradba celične stene gliv (Selitrennikoff, 2001, str. 2884).

Proteini celične stene imajo številne funkcije. Imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju integritete celice in zaščiti pred oksidativnim stresom, sodelujejo tudi pri interakcijah med celicami in so verjetno vključeni v biosintezo celične stene. Proteini celične stene so lahko kovalentno (preko glikozidnih ali esterskih vezi) ali nekovalentno (ionsko) vezani na glikansko omrežje (Yin et al., 2008).

Glikoproteini celične stene pri *S. cerevisiae* predstavljajo do 10 % vse biomase celice. Večina je s spremenjenim glikozil fosfatidil inozitolnim (GPI) sidrom kovalentno vezanih na  $\beta$ -1,6-glukan. Tvorijo se proteinsko-polisaharidni kompleksi, ki se razprostirajo stran od površine celice. Druga skupina proteinov celične stene so »proteini z notranjimi ponovitvami« (angleško »proteins with internal repeats« oziroma proteini »Pir«), ki prečno povezujejo  $\beta$ -1,3-glukanske verige. Proteini Pir so v notranjem skeletnem sloju celične stene (slika 7). Obstaja tudi manjša skupina proteinov celične stene, ki imajo v alkalnem okolju občutljivo vez (angleško »alkali-sensitive linkage« ozirom ASL). V celični steni so tudi proteini, ki so preko disulfidnih mostičkov vezani na druge proteine celične stene (Yin et al., 2005).



Slika 7: Model molekularne zgradbe celične stene kvasov s prikazanimi proteini (Smits et al., 2001, str. 782).

### 2.7.2 Proteomika gliv

Proteomske analize so mogočno orodje, ki omogočajo sistematsko razumevanje dogodkov na celičnem nivoju v določenem biološkem stanju (Kim et al., 2007). Namen proteomskega študija je pridobiti bolj globalen in integriran vpogled v biologijo s študijo vseh proteinov, ne le s spoznavanjem posameznih (Graves in Haystead, 2002).

Proteom je cel komplement proteinov, ki ga organizem ali sistem stvori v določenem času in določenem fiziološkem stanju (Kim et al., 2007), vključno z vsemi modifikacijami le-teh. Običajno je proteomika naslednji korak za genomiko pri študiju bioloških sistemov. Organizmov genom je konstanten z izjemami, kot so adicije genetskega materiala, ki jih povzročijo virusi, hitre mutacije, transpozicije itd. Proteom organizma se razlikuje od celice do celice, kajti določeni geni se izražajo v določenih celičnih tipih, oziroma se različni geni izražajo v različnih razmerah v okolju. Zato je proteomika mnogo bolj komplikirana kot genomika. Prav proteini in ne geni so odgovorni za fenotipe celic (Graves in Haystead, 2002). V evkariontskih sistemih so analize proteinov še posebej zanimive, saj omogočajo analizo specifičnih celičnih lokacij oziroma organelov (subproteomika) ter študijo post-translacijskih modifikacij proteinov, ki so izjemno pomembne v signalni transdukciji (Kim et al., 2007).

Redke proteomske analize gliv so bile v veliki večini opravljene le na filamentoznih predstavnikih. Filamentozne glice so pomembni organizmi, ne le ker so znani človeški in rastlinski patogeni, temveč tudi zaradi njihove uporabe v biotehnološki industriji za proizvodnjo številnih človeških terapevtikov (antibakterijskih ali antiglivnih agensov) in kemikalij, kot so komercialni encimi in organske kisline. Pomembnost filamentoznih gliv se kaže v povečanju števila sekveniranih genomov (do danes je sekveniranih in anotiranih 18 genomov različnih glivnih vrst), vendar je le malo opravljenih transkriptomskih in proteomskeh študij na filamentoznih glivah (Kim et al., 2007).

Kim in sodelavci (2006) so izdelali prvo znotrajcelično proteomsko mapo modelne filamentozne glive *Aspergillus nidulans* med osmoadaptacijo. Primerjali so izražanje proteinov v rastnem mediju brez soli ter v rastnem mediju s 4,5 % KCl (0,6 M KCl), tako da so proteine ločili z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in jih identificirali s posebnim tipom masne spektroskopije (MALDI-TOF ozziroma »matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight«). Izmed 90 differenčno izraženih proteinov so jih identificirali 30. V osmoadaptiranih celicah so dokazali povišano izražanje gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze in aldehid dehidrogenaze ter znižano izražanje enolaze. To kaže na povišano biosintezo glicerola in zmanjšano uporabo Krebsovega cikla. Pokazali so tudi povišan preobrat proteinov (povišana ekspresija in degradacija) ter identificirali pet novih proteinov, ki so vključeni v osmoadaptacijo ter imajo še neznano funkcijo (Kim et al., 2006).

Liang in sodelavci (2007) so opravili analizo proteoma ektomikorizne glive *Boletus edulis* pod slanostnim stresom, doseženim s 4 % (m/V) NaCl. Z dvodimenzionalno elektroforezo so našli 22 proteinov, ki so se differenčno izražali pod pogoji slanostnega stresa, 14 izmed njih je imelo višje izražanje pri slanostnem stresu, 8 pa nižje. Z masno spektroskopijo so identificirali 12 proteinov, ki so bili vključeni v celične procese, povezane s toleranco na slanost. Povišano je bilo izražanje encimov biosinteze metionina in S-adenozilmetyonina, ki izboljšata rast pri slanih pogojih. Pri slanostnem stresu se je encim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza izražal v večji meri. To kaže na povišano glikolizo, ki zagotavlja energijo in ima funkcijo

osmoregulacije (biosinteza glicerola). Več se izraža tudi proteinov vročinskega šoka, ki se inducirajo z različnimi okoljskimi stresi, tudi s slanostnim. V nasprotju s temi procesi pa se pri slanostnem stresu izraža manj proteina, ki je vključen v post-replikacijsko popravljanje DNK. To poviša mutagenezo, adaptivno strategijo, ki lahko potencialno poviša zmožnost preživetja v stresnih pogojih (Liang et al., 2007).

Pri raziskavah proteoma na sol tolerantne kvasovke *D. hansenii* so našli številne proteine, ki jih izpostavitev NaCl bodisi inducira ali represira. Ugotovili so, da se ob prisotnosti NaCl izrazi 28 % več proteinov kot pri pogojih brez soli. S soljo inducirani proteini so bili vključeni v sintezo/disimilacijo glicerola in v zgodnje poti glikolize, represirani proteini pa so bili encimi, vključeni v spodnji del glikolize, v pot h Krebsovemu ciklu in v sintezo aminokislin. Našli so tudi en inducirani protein vročinskega šoka ter dva represirana (Gori et al., 2007). Proteom *H. werneckii* je pokazal, da so njeni celični proteini bolj kisli (izoelektrične točke so med 4 in 5,5) od proteinov na sol občutljive *S. cerevisiae* in halotolerantne *D. hansenii* (Plemenitaš in Gunde-Cimerman, 2005).

Študije proteoma imajo celo vrsto aplikacij, kot so: anotacija genoma, študije izražanja, funkcije in (post-translacijske) modifikacije proteinov, lokalizacija in kompartmentalizacija proteinov ter spoznavanje interakcij med proteini (Graves in Haystead, 2002). Zunanji stres povzroči razlike oziroma spremembe v fiziološkem stanju, ki jih zaznamo na nivoju mRNK in na nivoju proteinov. Z analizo proteoma lahko torej primerjamo različna fiziološka stanja biološkega sistema. Proteomika je uporabno orodje za študije odzivov organizmov na abiotski stres. Identificiramo lahko proteine, povezane z določenim okoljskim signalom (Liang et al., 2007).

### 2.7.2.1 Subproteomika celične stene gliv

Proteomska analiza celične stene *Candida albicans* je pokazala kovalentno vezane proteine, ki so aktivno vključeni v prestrukturiranje in ekspanzijo celične stene ter v interakcije med gostiteljem in patogenom. Identificirali so encime, ki delujejo na ogljikove hidrate, in adhezine (de Groot et al., 2004).

Subproteomsko analizo proteinov celične stene na *S. cerevisiae* je opravil Yin sodelavci (2005). Tudi v tem primeru so našli številne kovalentno vezane proteine, med njimi GPI-sidrane proteine, ASL- proteine in glikanske hidrolaze. Ugotovili so, da imajo identificirani proteini pomembno vlogo pri pravilnem tvorjenju celične stene, saj so imele delečijske mutante v določenih proteinih nenavadno celično steno.

Opravljenih je malo proteomskih študij celične stene gliv. Med njimi ni moč najti analiz diferenčnega izražanja proteinov v različnih stresnih pogojih, na primer v pogojih znižane vodne aktivnosti, kot je to opravljeno za celoten proteom nekaterih gliv. Študije proteinov celične stene moti kontaminacija le-teh s proteini citosola, ki se sprostijo med postopkom njihove ekstrakcije. V tipičnem eksperimentu se proteine sprosti z netopne polisaharidne stene, loči z dvodimenzionalno elektroforezo glede na njihovo maso in izoelektrično točko. Nato se proteine proteolitsko fragmentira in nastale peptide identificira z masno spektroskopijo. Interpretacija rezultatov je prepogosto otežena zaradi prisotnosti proteinov citosola (Yin et al., 2008).

### 3 METODE IN MATERIALI

#### 3.1 UPORABLJENE VRSTE GLIV

Raziskovali smo fiziološke prilagoditve vseh treh vrst rodu *Wallemia*: *W. ichthyophaga*, *W. sebi* in *W. muriae*, ki smo jih vzeli iz Genske banke EX Katedre za biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Preglednica 1: Seznam in oznake preiskovanih sevov iz mikrobiološke zbirke.

Vrsta	EXF oznaka	Oznake v drugih zbirkah	Substrat	Država
<i>W. ichthyophaga</i>	EXF 994	/	Hiperslana voda solin	Slovenija
<i>W. sebi</i>	EXF 958	(=CBS 818.96) (=MZKI B-952,	seme sončnice hiperslana voda,	Švedska
<i>W. muriae</i>	EXF 951	=CBS 116628)	Sečoveljske soline hiperslana voda, kristalizacijski bazen,	Slovenija
<i>H. werneckii</i>	EXF 225	(=MZKI B-736)	Sečoveljske soline	Slovenija

#### 3.2 METODE DELA

##### 3.2.1 Submerzno gojenje gliv

Priprava sevov *Wallemia* spp. za submerzno gojenje:

Iz Mikrobiološke zbirke EX-F smo precepili vse tri vrste gliv *Wallemia* spp. v nova poševna gojišča MY50G in jih pustili rasti na sobni temperaturi 7 do 10 dni. Nato smo jih shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

Priprava predkulture:

V sterilno tekoče gojišče s kvasno dušikovo osnovo (YNB - Yeast Nitrogen Base) ustrezne slanosti smo s sterilno cepilno zanko prenesli eno kolonijo *W. ichthyophaga* in prašnate spore ene kolonije pri vrstah *W. sebi* in *W. muriae* iz trdnega gojišča MY50G. Vse tri vrste rodu *Wallemia* smo gojili v 500 ml Erlenmeyerjevih steklenicah s 150 ml gojišča YNB z določeno količino NaCl na stresalniku pri 28 °C in 180 obratih na minuto. Vsako izmed vrst smo gojili pri dveh izbranih slanostih.

Preglednica 2: Slanosti za gojenje vrst iz rodu *Wallemia*.

<i>Wallemia</i> spp.	Nižja slanost (% NaCl)	Višja slanost (% NaCl)
<i>W. ichthyophaga</i>	15	25
<i>W. sebi</i>	5	20
<i>W. muriae</i>	5	20

Priprava kulture:

Predkulturo smo gojili do stacionarne faze rasti in pripravili vcepek za kulturo. Del predkulture z usedlimi skupki celic smo sterilno prenesli v novo manjšo erlenmajerico, kar je omogočalo lažje pipetiranje in razmeroma enakomeren vcepek. Pipetirali smo s pritezano konico plastičnega nastavka polavtomatske pipete. Vsakokrat smo prenesli 1 ml predkulture v novo sterilno tekoče gojišče YNB enake slanosti kot izvorna predkultura. Kulture smo gojili pri enakih pogojih kot predkulture na stresalniku pri 28 °C in 180 obratih na minuto.

### 3.2.2 Izdelava rastnih krivulj za glive *Wallemia* spp. pri izbranih slanostih

*W. ichthyophaga*, *W. sebi* in *W. muriae* rastejo v tekočem gojišču YNB v bolj ali manj pravilnih skupkih mnogih celic, kar je zaradi usedanja le-teh onemogočilo uporabo metode optične gostote za spremeljanje rasti kulture. Zato smo rastne krivulje določili z merjenjem količine suhe biomase.

Pripravili smo tekoča gojišča YNB določene slanosti za posamezno vrsto. Za vsako slanost smo imeli pri vsaki vrsti po dve vzporednici. Za vcepke za pripravo kultur smo uporabili 1 ml predkulture v stacionarni fazi, gojene pri enaki slanosti kot kultura. Priprava predkultur je opisana v podpoglavlju 3.2.1. Pogoji gojenja so bili naslednji:  $27 \pm 1$  °C ter 180 obratov na minuto.

Biomaso smo vzorčili po naslednjem postopku:

- Biomaso smo vzorčili v časovnem zaporedju 2 do 3 dni.
- Vsakokrat smo filtrirali po dve steklenici kulture.

- Suhe filtre, ki so se čez noč sušili v sušilniku na 100 °C, smo prenesli v eksikator ter jih označene stehtali.
- Filter smo položili v Buchnerjev lij (filtrirni lijak z vodno črpalko), ga zmočili z raztopino enake slanosti, kot je bila v gojišču, in vsakokrat filtrirali celotno kulturo v Erlenmeyerjevi steklenici. Filter z biomaso smo sušili do konstantne teže in ga nato stehtali.
- Iz dobljenih meritev smo izdelali rastno krivuljo posamezne vrste za določeno slanost.

### **3.2.3 Meritve velikosti celic in skupkov celic ter teže vzorcev**

Predkulture in kulture vrst *Wallemia* smo pripravili, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.

Merili smo velikosti celic in skupkov celic posamezne vrste, gojene pri določeni slanosti v dveh vzporednicah.

#### **3.2.3.1 Meritve velikosti celic**

Pod svetlobnim mikroskopom smo opazovali nativne preparate posameznih vrst, ki so bile gojene pri določeni slanosti. Z digitalno kamero smo sliko prenesli na računalnik in s programom (Olympus DP-Soft 3.2.) izmerili dolžino in širino posameznih celic. Izračunali smo povprečje in standardno deviacijo meritev. Meritve smo opravili na 50 celicah posamezne slanosti *W. sebi* in *W. muriae* ter na 100 celicah *W. ichthyophaga*.

#### **3.2.3.2 Meritve velikosti skupkov celic**

Velikost skupkov celic *W. ichthyophaga* smo merili pod mikroskopom. Izmerili smo premer 50 skupkov celic, gojenih pri posamezni slanosti, v logaritemski fazi rasti. Izračunali smo povprečje in standardno deviacijo. Pri vrstah *W. sebi* in *W. muriae* pa so skupki preveliki za merjenje pod mikroskopom, zato smo jih merili na objektnem steklu s kljunastim merilom.

### 3.2.3.3 Meritve mase vzorcev

Rast v skupkih otežuje ponovljivost vzorčenja, zato smo z merjenjem suhe mase vzorcev želeli optimizirati postopek priprave vzorcev za analizo vsebnosti ionov.

Vzorčili smo s pritezano konico pipetnega nastavka na dva načina, in sicer:

- a. s pipetiranjem določenega volumna kulture (0,5 ml, 1 ml in 2 ml) pri *W. ichthyophaga* ter
- b. s pipetiranjem določenega števila skupkov (10 oziroma 20 skupkov) kulture pri *W. sebi* in *W. muriae*.

Te vzorce smo pripravili po enakem postopku, kot smo ga uporabljali za pripravo vzorcev za analizo vsebnosti ionov (filtracija s sistemom Millipore na nitroceluloznih filtrih, spiranje z ustrezno raztopino sorbitola, sušenje na 80 °C ter tehtanje), kot je opisano v podpoglavlju 3.2.5.1.

### 3.2.4 Meritve kompatibilnih topljencev

#### 3.2.4.1 Priprava vzorcev za meritve kompatibilnih topljencev

Merili smo vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah gliv, gojenih pri dveh različnih slanostih. Vzorce za meritve predstavlja liofilizirana biomasa. Priprava vzorcev vključuje pripravo kulture, pripravo materiala in pribora ter filtracijo biomase. Med delom smo pazili, da se ničesar nismo dotikali z golimi rokami; s priborom in materialom smo skozi cel postopek rokovali le z rokavicami.

Priprava materiala:

- Nitrocelulozne filtre smo namočili v vodo MilliQ in vodo zamenjali najmanj trikrat. Filtri so do uporabe ostali v vodi.
- Sistem za filtracijo Millipore smo dobro oprali z destilirano vodo in nato trikrat sprali z MilliQ in ga posušenega avtoklavirali.

- Pinceto, skalpel, spatulo in puhalke smo oprali z destilirano vodo, z vodo MilliQ in jih posušili.
- Pripravili smo si 10-kratno založno raztopino, iz katere smo sproti pripravljali sveže tekočine za spiranje celic. Uporabili smo enako koncentracijo soli, kot je bila v gojišču.
- Označili in stehtali smo mikrocentrifugirke, v katere smo kasneje dajali sprane celice.
- Pripravili smo si stiroporasto posodo z ledom.

#### Priprava kulture:

- Kulture smo pripravili tako, da smo inokulirali 1 ml predkulture v sveže tekoče gojišče YNB enake slanosti. Predkulture so bile pripravljene, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.
- Glede na rastno krivuljo smo določili točko vzorčenja v logaritemski fazì rasti posamezne vrste glive pri določeni slanosti.
- Kultura se je stresala ves čas do filtracije. Celotno vsebino erlenmajerice smo postopoma filtrirali.

#### Filtracija biomase:

- Moker, čist filter (filtri Milipore s premerom por 0,45 µm) smo položili na nosilec sistema za filtracijo in zaprli primež.
- Čezenj smo zlili od 30 do 50 ml kulture naenkrat. Robove menzure in celice smo sprali z približno 10 ml ohlajene tekočine za spiranje celic, ki je bila med delom shranjena na ledu.
- Primež smo razdrli, s pinceto in skalpelom odstranili filter ter ga položili na vrh notranje stene menzure. Na nosilec smo dali svež moker filter.
- Celice s prvega filtra smo s curkom spiralne tekočine sprali na drugi filter. Še enkrat smo sprali notranjo steno menzure s približno 10 ml spiralne tekočine.
- Filtrirali smo toliko časa, da so se celice dobro osušile.
- Primež smo razdrli in s spatulo postrgali celice s filtra v označene mikrocentrifugirke, ki smo jih hranili na ledu.

- Pri posamezni filtraciji pridobljeno biomaso smo zamrznili v tekočem dušiku in jo do liofilizacije shranili v zamrzovalni skrinji na -80 °C.

Liofilizacija vzorcev:

- Mikrocentrifugirke smo odprli, jih prekrili s parafilmom in ga nekajkrat preluknjali.
- Vse epice naenkrat smo 48 ur susili v liofilizerju pri temperaturi -35 °C in v vakuumu.
- Po končani liofilizaciji smo mikrocentrifugirke shranili v eksikatorju, dokler nismo odstranili parafilma, jih zaprli in stehtali.
- Do pošiljanja na analizo s HPLC smo jih shranili v zamrzovalni skrinji na -20 °C.

### 3.2.4.2 Določitev vrste in količine kompatibilnih topljencev s HPLC

Postopki ekstrakcije ter detekcije in karakterizacije poliolov, ki so jih opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in biotehnologijo univerze v Bonnu, so opisani v članku Kogej et al. (2007).

HPLC je tip tekočinske kromatografije za ločitev raztopljenih komponent v vzorcu. Mešanica komponent se vbrizga v ločitveno kolono, kjer se le-te ločijo glede na različno hitro prehajanje preko kolone zaradi različnih porazdelitev med mobilno in stacionarno fazo (Analytical Chemistry and Instrumentation, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), 1996).

Vsebnosti kompatibilnih topljencev so podane v milimolih na gram suhe biomase. Preračunane so glede na znane količine standardov.

### 3.2.5 Meritve koncentracije ionov

Meritve koncentracije ionov ( $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$ ) z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS) smo za *W. ichthyophaga* najprej izvedli preliminarno, z namenom optimizacije priprave vzorcev. Želeli smo pridobiti optimalno količino biomase na filtru, da za meritve ni potrebno redčenje,

in zagotoviti ponovljivost vzorčenja, kar predstavlja težavo pri rasti celic v skupkih. Pred nadaljevanjem priprave vzorcev za vse tri vrste *Wallemia* spp. smo merili teže skupkov in celic ter preizkušali način ponovljivega vzorčenja. Za vrsti *W. sebi* in *W. muriae* smo kot optimalen način vzorčenja izbrali filtracijo določenega števila skupkov. Za vrsto *W. ichthyophaga* pa smo izbrali pipetiranje določene prostornine kulture s prirezano konico pipetnega nastavka.

Za vsako slanost smo vzorce pripravili v treh vzporednicah (3 Erlenmeyerjeve steklenice), iz vsake vzporednice pa smo pripravili po 6 vzorcev. Preliminarno smo vzorčili logaritemsko in stacionarno fazo rasti, vendar smo slednjo v nadaljevanju poskusa opustili. Vsebnosti ionov v stacionarni fazi, ko celice že propadajo, so spremenljive in nerealne. Vsebnost kompatibilnih topljencev v stacionarni fazi ni bila bistveno drugačna, zato smo se v nadalnjem delu osredotočili na logaritemsko fazo rasti.

### 3.2.5.1 Priprava vzorcev za meritve koncentracije ionov

Vzorce za meritve koncentracije ionov predstavlja suha biomasa na nitroceluloznem filtru. Priprava vzorcev vključuje pripravo materiala in pribora, pripravo kulture ter filtracijo biomase.

Med delom smo pazili, da se ničesar nismo dotikali z golimi rokami; s priborom in materialom smo ves čas rokovali le z rokavicami, tako da ni prišlo do kontaminacije z  $\text{Na}^+$  ioni. Material smo spirali z destilirano vodo in MilliQ, steklovino tudi z 10 % HCl, da smo izključili možnost kontaminacije s  $\text{K}^+$  ioni.

Priprava materiala:

- Nitrocelulozne filtre Milipore s premerom por 0,45  $\mu\text{m}$  smo označili in jih v steklenih petrijevkah sušili v sušilniku pri 80 °C. Suhe filtre smo v eksikatorju prenesli do tehtnice in jih stehtali v najkrajšem možnem času, da niso vezali zračne vlage.

- Filtre smo namočili v vodo MilliQ in vodo zamenjali najmanj trikrat. Filtri so do uporabe ostali v vodi.
- Čiste nove plastične epruvete smo trikrat sprali z vodo MilliQ ter jih posušili.
- Vso uporabljeno steklovino (čaše in sistem za filtracijo Millipore) smo sprva oprali z 10 % HCl, nato smo jo trikrat sprali z destilirano vodo in nato še trikrat z MilliQ. Posušeni sistem za filtracijo smo avtoklavirali.
- Pinceto, skalpel, spatulo in puhalke smo oprali z destilirano vodo, z vodo MilliQ in jih posušili.
- Pripravili smo si svežo tekočino za spiranje celic, pri kateri smo namesto NaCl uporabili sorbitol, tako da smo dosegli enak osmotski tlak (za 1 M NaCl smo pripravili 2 M sorbitol).

#### Priprava kulture:

- Kulture smo pripravili na enak način kot za meritve kompatibilnih topljencev, kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.
- Glede na rastno krivuljo smo določili točko vzorčenja v logaritemski fazi rasti posamezne vrste glive pri določeni slanosti.
- Kultura se je stresala ves čas do filtracije. Filtrirali smo določeno prostornino kulture pri *W. ichthyophaga* oziroma določeno število skupkov celic pri *W. sebi* in *W. muriae*, kot je razvidno iz spodnjega seznama:

#### 1) Preliminarni poskus za *W.ichthyophaga*

Vzorčili smo v logaritemski in stacionarni fazi rasti.

% NaCl v gojišču YNB	Volumen filtrirane kulture
15	0,5 ml in 2,0 ml
25	0,5 ml in 2,0 ml

## 2) Končni poskus

Pri vseh treh vrstah smo vzorčili v logaritemski fazi rasti.

### *W. ichthyophaga*

% NaCl v gojišču YNB	Volumen filtrirane kulture
15	0,5 ml
25	1,0 ml

### *W. sebi*

% NaCl v gojišču YNB	Število filtriranih skupkov
5	10
20	20

### *W. muriae*

% NaCl v gojišču YNB	Število filtriranih skupkov
5	10
20	10

Filtracija biomase:

- Moker, čist filter smo s pinceto položili na nosilec malega sistema za filtracijo Millipore in zaprli primež.
- Na filter smo odpipetirali določen volumen oziroma določeno število skupkov. Vzorec smo sprali s približno 10 ml ohlajene tekočine za spiranje celic, ki smo jo med delom hranili na ledu.
- Primež smo razdrli, s pinceto in skalpelom odstranili filter ter ga položili na vrh notranje stene menzure. Na nosilec smo položili svež moker filter.
- Celice s prvega filtra smo s curkom spiralne tekočine sprali na drugi filter. Še enkrat smo sprali notranjo steno menzure s približno 10 ml spiralne tekočine.
- Filtrirali smo toliko časa, da so se celice dobro osušile.
- Primež smo razdrli in s čistim skalpelom in pinceto odstranili filter.
- Filtre smo položili na staničevino v stekleni petrijevki in jih sušili pri 80 °C do konstantne teže (24 ur).

- Petrijevke smo v eksikatorju prenesli do tehtnice, kjer smo jih stehtali tako, da so bili najkrajši možni čas na zraku.
- Posamezen posušen in stehtan filter smo dali v čisto plastično epruveto in jo zaprli s pokrovčkom. Do pošiljanja smo vzorce shranili na -20 °C.

### 3.2.5.2 Določitev koncentracije ionov z AAS

Meritve vsebnosti ionov so izvedli v Laboratoriju za agrikulturno mikrobiologijo Oddelka za mikrobiologijo Univerze v Cordobi, Španija.

Atomska absorpcijska spektroskopija (AAS) je tehnika, ki uporablja absorpcijo svetlobe za merjenje koncentracije atomov v plinski fazi. Tekoč ali trden vzorec s preiskovanimi atomi ali ioni je potrebno najprej upliniti v grafitnem uparjevalniku. Atomi absorbirajo ultravijolično ali vidno svetlichtvo, kar povzroči prehod v višji elektronski energijski nivo. Koncentracija analita se določi glede na količino absorpcije iz umeritvene krivulje (Analytical Chemistry and Instrumentation, AA Spectroscopy, 1996).

Ekstrakcija ionov iz celic za meritve vsebnosti ionov:

- V vsako epruveto so dodali 5 ml na 4 °C ohlajene tekočine za ekstrakcijo, tako da so bili filtri pokriti s tekočino. Do meritve so vzorce shranili na 4 °C.
- Pred meritvijo z AAS so vzorce premešali na vibracijskem mešalniku in nato centrifugirali (5 minut pri 5000 obratih na minuto).
- Ker je bila koncentracija ionov v vzorcu večja od 30 µM, je bilo potrebno redčenje. Redčili so 1:5 (1 ml vzorca v 4 ml MilliQ) in 1:40 (0,1 ml vzorca v 3,9 ml MilliQ).

Atomski absorpcijski spektrometer se pred meritvami kalibrira z raztopino Na<sup>+</sup> oziroma K<sup>+</sup> v koncentracijah 10, 20 in 40 µM. Meritve v tem območju so linearne in so podane v enotah nmol/ml. Če je meritev izven tega območja, je potrebno vzorce redčiti.

Koncentracijo ionov v celicah ( $c_i$ ) preračunamo po formuli (1). Rezultati vsebnosti  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  so podani v nmol/mg suhe teže.

$$c_i = \frac{c * V_{ek}}{SB} \quad \left[ \frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \right] \quad \dots (1)$$

$c$  – izmerjena koncentracija iona (nmol/ml);

$V_{ek}$  – volumen ekstrakcijske tekočine (5 ml);

$SB$  – suha biomasa (mg)

### **3.2.6 Preiskava proteoma celične stene in citosola *W. ichthyophaga* in *H. werneckii* z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo**

Dvodimenzionalna gelska elektroforeza (2DEF) je metoda za analizo kompleksnih proteinskih mešanic, ekstrahiranih iz celic, tkiv ali drugih bioloških vzorcev. Proteine loči glede na dve lastnosti v dveh ločenih dimenzijah. Prva dimenzija je izoelektrično fokusiranje (IEF), ki proteine loči glede na izoelektrično točko, druga pa SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE), ki jih loči še glede na molekulsko maso. Vsaka lisa, ki jo dobimo po vizualizaciji na gelu, ustreza eni vrsti proteina v vzorcu. Tako dobimo informacijo o izoelektrični točki, molekulski masi in tudi količini proteina.

Postopek 2DEF se začne s pripravo vzorca proteinov (opisan v poglavju 3.2.6.1). Ta korak je ključen za kvaliteten 2-D rezultat, zato smo pripravi vzorca posvetili mnogo truda in izvedli številne optimizacije.

Pripravi vzorca sledi 2DEF, katere eksperimentalno zaporedje je naslednje:

1. Rehidracija traku IPG

Trakovi IPG so suhi in jih je potrebno pred IEF rehidrirati v rehidracijskem pufru ustrezne sestave.

## 2. IEF

Prva dimenzija se izvede pri visokih napetostih z aktivno regulacijo temperature.

## 3. Ekvilibracija traku IPG

Ekvilibracija trakov IPG v pufru z SDS pripravi vzorce na ločitev v drugi dimenziji.

## 4. SDS-PAGE

Trak IPG je potrebno vstaviti v poliakrilamidni gel za drugo dimenzijo.

## 5. Vizualizacija

Proteinske lise odkrivamo z različnimi metodami označevanja in barvanja. Uporabljali smo barvanje s srebrovim nitratom in barvanje z barvilo Coomassie.

## 6. Analiza rezultatov

Obarvane gele se s pomočjo optičnega čitalca shrani v digitalni obliki, razporeditev lis na gelu pa se lahko analizira z računalniškim programom. Pri našem poskusu smo zaradi razmeroma majhnega števila lis to opravili s prostim očesom. Želene lise se izreže iz gela in analizira vrsto proteina s pomočjo masne spektroskopije.

### 3.2.6.1 Priprava vzorcev proteinov

Celice obeh vrst (*Wallemia ichthyophaga* in *Hortaea werneckii*) smo v tekočem gojišču YNB dveh slanosti pri standardnih pogojih (28 °C in 180 obratov na minuto) gojili do logaritemske faze rasti, skoncentrirali biomaso, jo homogenizirali in izolirali proteine celične stene in citosola. Po 1 ml izolata v mikrocentrifugirki smo zmrznili v tekočem dušiku in do uporabe shranili v zamrzovalni omari na -80°C.

Vzorci za analizo proteinov z dvodimensionalno SDS-PAGE elektroforezo:

- proteini celične stene in citosola *W. ichthyophaga* pri 15 % in 25 % NaCl v tekočem gojišču YNB
- proteini celične stene in citosola *H. werneckii* pri 15 % in 25 % NaCl v tekočem gojišču YNB

### Pridobivanje biomase za izolacijo proteinov

Celice v tekočem gojišču YNB je bilo potrebno skoncentrirati, da smo pridobili določeno količino biomase za izolacijo proteinov. Za posamezno vrsto določene slanosti smo potrebovali približno 5 g sveže biomase.

Postopek priprave:

- Kulturo smo centrifugirali 8 minut pri sobni T (20 – 22 °C) in 6000 obratih na minuto.
- Celice smo združili v dve centrifugirki ter prilili spiralni pufer (10 mM Tris HCl, pH = 7.5). Ponovno smo centrifugirali, odlili supernatant in celice še enkrat sprali s spiralnim pufrom.
- Pridobljeno biomaso smo stehtali in zamrznili v tekočem dušiku in shranili v zamrzovalni omari na -80 °C.

### Homogenizacija biomase za izolacijo proteinov

- Očiščeno in avtoklavirano terilnico smo ohladili s tekočim dušikom.
- Zamrznjeno biomaso smo takoj zalili s tekočim dušikom in trli do prahu. Med postopkom smo ves čas dolivali tekoči dušik.
- Kovinsko posodico s kroglico dismembranatorja smo ohladili s tekočim dušikom in z ohlajeno žličko prenesli strte celice v kovinsko posodico, ki smo jo vpeli na dismembranator.
- Dismembrirali smo 3 minute pri maksimalni frekvenci.
- Tako homogenizirane celice smo stehtali in jih po 2,5 g razdelili v dve plastični epruveti.

**Izolacija proteinov celične stene in proteinov citosola iz *W. ichthyophaga* in *H. werneckii*****Postopno centrifugiranje za pripravo citosola:**

- 2,5 g strtih celic smo v 50 ml centrifugirki resuspendirali v 10 ml homogenizacijskega pufra z dodano mešanico proteaznih inhibitorjev (PIC, Protease Inhibitor Coctail)
- 20 minut smo obračali na ledu.
- Centrifugirali smo 10 minut pri 500 g in 4 °C.
- Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in centrifugirali 20 minut pri 20.000 g in 4 °C.
- Supernatantu smo dodali 2 M CaCl<sub>2</sub> do končne koncentracije 16 mM.
- Inkubirali smo 10 minut na ledu, da so se oborili mikrosomi.
- Centrifugirali smo 15 minut pri 20.000 g in 4 °C.
- Supernatantu, ki je vzorec citosola, smo določili koncentracijo proteinov po metodi Bradford, jih zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C.

**Izolacija proteinov celične stene:**

- 2,5 g mokre teže celic smo v 50 ml falkonki resuspendirali v 30 ml pufra za resuspendiranje (10 mM Tris HCl, pH = 7.5) z dodanim PIC.
- 20 minut smo obračali na ledu.
- Centrifugirali smo 10 minut pri 500 g in 4 °C.
- Usedlino smo resuspendirali v 10-kratnem volumnu pufra za ekstrakcijo proteinov (50 mM Tris HCl, pH= 7.8, 2 % SDS, 100 mM EDTA, 40 mM β-merkaptoetanol) z dodanim PIC in inkubirali 5 minut pri 100 °C v vodni kopeli.
- Centrifugirali smo 10 minut pri 500 g in 4 °C.
- Usedlino smo ponovno resuspendirali v 10-kratnem volumnu pufra za ekstrakcijo proteinov z dodanim PIC in inkubirali 5 minut pri 100 °C v vodni kopeli.
- Centrifugirali smo 10 minut pri 500 g in 4 °C.
- Usedlino smo trikrat sprali z MilliQ (centrifugiranje: 10 minut pri 500 g in 4 °C), zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri – 80 °C.

- Pred začetkom 2DEF smo usedline resuspendirali v 3 ml nativnega pufra za lizo NLB, suspenzijo razdelili v mikrocentrifugirke po 1 ml in določili koncentracijo proteinov po metodi Bradford.

#### Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

Gre za kolorimetrično metodo, ki temelji na proporcionalni vezavi barvila Coomassie Blue G (Roti® Nanoquant) na proteine. Pod močno kislimi pogoji je barvilo najbolj stabilno kot dvojno protonirana oblika, ki je rdeče barve (založna raztopina barvila, ki je 5-krat koncentrirana). Ob vezavi na protein je najbolj stabilna deprotonirana oblika barvila, ki je modre barve. Absorpcijo merimo pri valovni dolžini 595 nm (ozioroma pri 600 nm ali 590 nm). Z naraščanjem koncentracije proteina temni barva vzorca. V območju 5 – 25 µg/ml je odnos med koncentracijo proteina in absorpcijo linearen.

Z govejim serumskim albuminom (standard BSA z založno koncentracijo 10 mg/ml) smo pripravili umeritveno krivuljo. Založno barvilo Roti Nanoquant smo redčili z MilliQ v razmerju 1:4. V mikrocentrifugirkah smo pripravili razredčine standarda BSA (od 5 do 25 µg/ml). Redčili smo v enakem pufru kot je končni vzorec.

V plastični kiveti smo zmešali 1 ml barvila Coomassie Blue G ter 10 µl razredčene raztopine BSA. Kivete smo pokrili s parafilmom, premešali in inkubirali od 10 do 30 minut pri sobni temperaturi. Absorpcijo svetlobe na spektrofotometru smo izmerili pri 595 nm. Če je bila njena vrednost izven območja linearne odvisnosti absorpcije svetlobe od koncentracije proteinov (večja od 1,0), smo vzorec ustrezno redčili.

### Koncentriranje vzorca proteinov z acetonsko precipitacijo

Izmerjena koncentracija proteinov celične stene in citosola, izoliranih iz *W. ichthyophaga*, je bila nizka v primerjavi s koncentracijo proteinov celične stene in citosola *H. werneckii*. Vzorce proteinov *W. ichthyophaga*, smo zato koncentrirali z obarjanjem v acetonu in ponovnim raztplavljanjem v manjšem volumnu rehidracijskega pufra.

Postopek acetonskega obarjanja proteinov:

- Vzorcem proteinov v mikrocentrifugirki smo dodali štirikratni volumen hladnega acetona.
- Vzorce smo premešali na vibracijskem mešalniku in jih inkubirali čez vikend v skrinji na - 20 °C.
- Nato smo jih centrifugirali 10 minut pri 14.000 g in supernatant previdno odlili.
- Usedline smo sušili pri sobni temperaturi vsaj 30 minut.
- Usedline večih mikrocentrifugirk smo združili in resuspendirali v ustrezнем volumnu rehidracijskega pufra za nanos na trak IPG.

### Ekstrakcija proteinov celične stene iz vzorca *H. werneckii*

Ker je bila ekstrakcija v rehidracijskem pufru zelo slaba, smo poskusili dodatno ekstrahirati proteine s 5 % SDS. Ekstrahirali smo dve vzporednici lizata CW\_Hw\_10 in CW\_Hw\_25.

Protokol:

- 200 µl lizata CW v mikrocentrifugirki smo dodali 200 µl 5 % SDS in 5 µl PIC in dobro premešali na vibracijskem mešalniku.
- Stresali smo čez noč pri 50 °C in 1000 obratov na minuto.
- Centrifugirali smo 5 minut pri 10.000 g in 15 °C.
- Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in določili koncentracijo proteinov z BCA™ Protein Assay po navodilih proizvajalca.

- Želeli smo pridobiti 500 µg proteinov, zato smo ustreznemu volumnu vzorca proteinov dodali štirikratni volumen acetona in 1 uro obarjali na sobni temperaturi.
- Centrifugirali smo 15 minut pri 10.000 g in 15 °C, usedlino smo nato sprali z 80 % acetonom in jo sušili 30 minut na sobni temperaturi.
- Usedlino smo resuspendirali v 550 µl rehidracijskega pufra in stresali 15 minut pri 1000 obratih na minuto.
- Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 15 °C in 12.000 g.
- Supernatanta dveh vzporednih vzorcev smo prenesli v novo mikrocentrifugirko.

#### Določanje koncentracije proteinov s kompletom BCA™ Protein Assay Kit

Vzorcema proteinov celične stene *H. werneckii* smo določili koncentracije proteinov s kompletom BCA™ Protein Assay Kit po navodilih proizvajalca.

Metoda temelji na redukciji Cu<sup>2+</sup> do Cu<sup>1+</sup> s proteini v bazičnem okolju, pri čemer se Cu<sup>1+</sup> zazna kolorimetrično z reagentom, ki vsebuje bicinkoninsko kislino. Prisotnost proteinov povzroči spremembo barve reagenta iz zelene v vijolično. Absorpcijo se meri pri valovni dolžini 560 nm.

### 3.2.6.2 Dvodimenzionalna gelska elektroforeza proteinov *W. ichthyophaga* in *H. werneckii*

Poskus 2DEF proteinov iz *W. ichthyophaga* in *H. werneckii* smo izvedli petkrat. Med posameznimi poskusi smo skušali optimizirati postopek priprave vzorcev, ekstrakcije proteinov in vizualizacije rezultatov.

Preglednica 3: Vsi poskusi 2DEF.

	<b>1.poskus 2DEF</b>	<b>2.poskus 2DEF</b>	<b>3.poskus 2DEF</b>	<b>4.poskus 2DEF</b>	<b>5.poskus 2DEF</b>
<b>Vzorci proteinov</b>	Wi_CW_15, Wi_CW_25	Hw_CW_10, Hw_CW_25 Hw_CIT_10, Hw_CIT_25	Wi_CW_15, Wi_CW_25 Hw_CW_10, Hw_CW_25	Wi_CW_15, Wi_CW_25 Hw_CW_10, Hw_CW_25	Hw_CW_10, Hw_CW_25
<b>Količina proteinov na gelu</b>	50 µg	200 µg	200 µg	312 µg pri Wi_CW; 200 µg pri Hw_CW	477 µg pri 3-10 NL; 368 µg pri 4-7 NL
<b>IEF- razmak ločitve pH</b>	3-10 NL	3-10 NL	3-10 NL	3-10 NL	3-10 NL in 4-7 NL
<b>Metoda vizualizacije</b>	Barvanje s srebrom	Barvanje s srebrom po Mortzu	Barvanje s srebrom po Mortzu	Barvanje s Coomassie barvilom	Barvanje s Coomassie barvilom
<b>Rezultat</b>	Ni vidnih proteinskih lis	Vidne proteinske lise na gelih	Vidne proteinske lise na gelih	Pri Wi izrezali 10 proteinskih lis. Pri Hw ni bilo vidnih lis.	Iz 3-10 NL gela izrezali 10 lis. Iz 4-7 NL gela izrezali 6 lis.

Legenda:

Wi\_CW\_15 in Wi\_CW\_25: proteini celične stene *W. ichthyophaga* pri 15 % in 25 % soli v gojišču

Wi\_CIT\_15 in Wi\_CIT\_25: proteini citosola *W. ichthyophaga* pri 15 % in 25 % soli v gojišču

Hw\_CW\_10 in Hw\_CW\_25: proteini celične stene *H. werneckii* pri 15 % in 25 % soli v gojišču

Hw\_CIT\_10 in Hw\_CIT\_25: proteini citosola *H. werneckii* pri 15 % in 25 % soli v gojišču

NL: nelinearen razmak ločitve pH

Postopek 2DEF:

### 1. Rehidracija in IEF

V mikrocentrifugirko smo dali:

- Ustrezan volumen vzorca glede na želeno količino proteinov v gelu.
- 2,5 µl Amfolita
- 3,75 µl 2 M DTT (komercialni 20x »Reducing Agent«)
- Ustrezan volumen rehidracijskega pufra, tako da je bil končni volumen vzorca na gelu 550 µl.

Vsako mikrocentrifugirko smo 20 sekund mešali na vibracijskem mešalniku in jo nato centrifugirali pri 15 °C in 12.000 g 10 minut, da smo se znebili netopnih nečistoč v vzorcu. Supernatant smo odpipetirali v keramični nosilec za trak IPG ter ga enakomerno razporedili. Trak IPG (24 cm, nelinearen gradient pH) smo v nosilec vstavili v takšni orientaciji, da je bila nižja (kisla) vrednost pH na katodi. Čezenj smo nakapljali približno 1,5 ml mineralnega olja, da ne bi prišlo do izsušitve, in nosilec pokrili s pokrovčkom.

Na aparatu za izoelektrično fokusiranje Ettan<sup>TM</sup> IPGphore<sup>TM</sup> II IEF smo nastavili sledeč program:

Program Prot #5 KKND5

<u>Rehidracija</u>	<u>10 h</u>	Maksimalni tok:
S1	100 V	2 h
S2	200 V	1 h
S3	500 V	1 h
S4 gr	10000 V	1 h
S5 gr	8000 V	3 h
<u>S6</u>	<u>8000 V</u>	<u>6 h</u>
S7	500 V	12 h

Skupna vsota napetosti: ~73,9 kWh  
Trajanje: 24 ur  
Temperatura: 20 °C

Pasivna rehidracija je potekala 10 ur, aktivna (korak S1) pa 2 uri pri napetosti 100 V. Slednja pospeši vstop večjih proteinov v gel IPG traku. Izoelektrično fokusiranje je potekalo v korakih S2 do S6. Prvi korak (S2) traja eno uro pri napetosti 200 V, drugi korak (S3) pa prav tako eno uro pri 500 V. Sledita dva koraka z gradientno naraščajočo napetostjo; enourni korak S4 gr, ki narašča do 1000 V, ter triurni korak S5 gr, kjer napetost naraste do 8000 V. Konstantna napetost 8000 V se nato v koraku S6 vzdržuje 6 ur, ko se izoelektrično fokusiranje zaključi. Korak S7 drži vzorce pod napetostjo 500 V, dokler ne začnemo z ekvilibracijo.

### **Priprava SDS poliakrilamidnih gelov (SDS-PAGE)**

Pripravili smo 12,5% poliakrilamidni gel s 4 % SDS.

Preglednica 4: Sestava SDS poliakrilamidnega gela.

Vrstni red	Sestavina	Volumen za pripravo dveh gelov
1.	voda MilliQ	36,4 ml
2.	1,5 M Tris HCl, pH 8,8	30,1 ml
3.	Akril amid + Bisakril amid (37,5:1)	50,1 ml
4.	10 % SDS	2,4 ml <sup>1</sup>
5.	10 % APS	1,2 ml
6.	10 % TEMED	40 µl <sup>2</sup>

Totalni volumen: 120 ml

<sup>1</sup>... koncentracija SDS je dvojna

<sup>2</sup>... koncentracijo TEMED smo zmanjšali na 40 µl, da je gel počasneje polimeriziral

Tekočo raztopino gela smo nalivali med dve stekleni plošči z distančnikom. Dimenziije gela so bile: 26 cm x 20 cm x 1 mm. Za pripravo enega gela smo potrebovali od 50 do 60 ml raztopine. Vstavili smo še glavniček, s katerim smo ustvarili podolgovato režo za trak IPG ter manjšo jamico za proteinski marker. Gele smo pustili polimerizirati vsaj dve uri.

### **Ekvilibracija vzorcev**

Trakove IPG smo po izoelektričnem fokusiranju po hrbtni strani sprali z deionizirano vodo MilliQ in jih v postopku ekvilibracije pripravili na drugo dimenzijo, to je ločitev proteinov po velikosti v SDS poliakrilamidnem gelu.

Trakove smo posamezno vstavili v cevko z ekvilibacijskim pufom (EQB) po naslednjem vrstnem redu:

1. EQB z DTT (ditiotreitol): 10 ml EQB + 100 mg DTT
2. EQB brez DTT
3. EQB z IAA (jodoacetamid): 10 ml EQB + 250 mg IAA

Trakove IPG smo v vsakem EQB inkubirali 15 minut na stresalniku.

### **Vstavljanje trakov IPG v SDS poliakrilamidni gel**

Trakove IPG smo potisnili v režo do gela, tako da je bil stik med trakom in gelom čim tesnejši. Trakove smo pritrdili na gel tako, da smo jih zalili z 0,5 % (m/V) agarozo z dodanim bromtimol modrim.

### **Vertikalna SDS-PAGE**

Ločitev proteinov glede na njihovo molekulsko maso je potekala z vertikalno SDS-PAGE v Ettan<sup>TM</sup> DALTsix elektroforetskem sistemu.

Plošče z gelom in trakom IPG smo namestili na nosilec v enaki orientaciji. V elektroforetsko posodo smo natočili približno 3,5 l SDS elektroforetskega pufra (25 mM Tris HCl, pH = 8.3, 1,92 M glicin, 0,2 % SDS) in vstavili nosilec s ploščami. Do označenega roba smo dolili še preostanek SDS elektroforetskega pufra (približno 1 l).

Ko je bil pufer že nalit, smo v enega izmed gelov nanesli 10 µl proteinske lestvice. Vklopili smo še hlajenje in mešanje pufra. Nastavili smo program za drugo dimenzijo aparata Ettan<sup>TM</sup> DALTsix. Elektroforeza je potekala pri 2 W na gel.

Začetni pogoji za štiri gele: 48 V, 167 mA, 8 W

Končni pogoji za štiri gele: 112 V, 71 mA, 8 W

Druga dimenzija je bila končana po 16 do 17 urah. Tedaj smo izvlekli nosilec z geli, plošče sprali z destilirano vodo in v banjici s fiksacijskim pufrom razdrli stekleni ploščici ter sprostili gel.

### 3.2.6.3 Metode detekcije proteinov na SDS-PAGE

Za gele druge dimenzije smo uporabili več metod vizualizacije proteinskih lis. Sprva smo gel barvali s srebrovim nitratom po metodi, ki je kompatibilna z masno spektroskopijo. Ta metoda je najbolj občutljiva neradioaktivna metoda. Z njo smo želeli vizualizirati čim več proteinskih lis. Različico te metode, to je za masno spektroskopijo modificirano barvanje s srebrom po Mortzu, smo nato uporabljali za barvanje gelov s proteini *H. werneckii* (tako celične stene kot citosola) ter *W. ichthyophaga* (le proteinov celične stene). Vzorce citosola smo v nadalnjem delu opustili, ukvarjali smo se le s proteinimi celične stene obeh vrst pri dveh različnih slanostih.

Iz s srebrom barvanega gela izrezane lise proteinov z masno spektroskopijo niso prinesle rezultatov. Verjetno so bile količine proteinov prenizke. Zato smo se odločili povišati količino proteinov, ki smo jih nanesli na gel, ter spremeniti metodo barvanja. Uporabili smo bolj kvantitativno metodo, to je barvanje z barvilkom Coomassie, ki pa je od 50 do 100-krat manj občutljivo od barvanja s srebrom. Pred uspehom barvanja z barvilkom Coomassie smo morali še povečati koncentracijo proteinov z dodatno ekstrakcijo proteinov iz celične stene, saj smo med delom ugotovili, da je ekstrakcija proteinov v rehidracijskem pufru slaba in je na gelu dejansko manj proteinov kot smo jih predvideli. V primeru barvanja s Coomassie barvilkom smo sicer dobili manj vidnih proteinskih lis, vendar dovolj proteinov za analize z masno spektroskopijo.

Protokoli barvanja proteinov na gelu:

1. Barvanje s srebrom po Mortzu (modificirano za masno spektroskopijo)

- Po končani drugi dimenziji smo posamezen gel sprostili s steklenih plošč v banjicah z 200 ml fiksacijskega pufra (50 % metanol, 12 % ocetna kislina, 0,05 % formalin), tako da je le-ta prekril gel. Fiksacija je potekala čez noč med rahlim stresanjem na orbitalnem stresalniku.
- Gel smo nato trikrat po 20 minut spirali s 35 % raztopino etanola.
- Sprane gele smo 5 minut inkubirali v senzitizacijskem pufru (0,02 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).
- Sledilo je trikratno spiranje z destilirano vodo, vsakič po 5 minutnem stresanju.
- Gele smo barvali z raztopino srebrovega nitrata (0,2 %  $\text{AgNO}_3$ , 0,076 % formaldehid) 20 minut.
- Sledilo je ponovno spiranje z destilirano vodo, in sicer dvakrat po 1 minuto.
- Vsako banjico smo od tega koraka dalje tretirali posebej. Na gel smo vlili 200 ml razvijalca (6 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,05% formaldehid, 0,0004 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) in opazovali nastajajoče lise. Barvali smo od 5 do 10 minut. Preden se je ozadje začelo barvati, smo razvijalec odlili. Čez gel smo nalili 200 ml pufru za zaustavitev razvijanja (stop-raztopina; 50 % metanol in 12 % ocetna kislina) in stresali dodatnih 5 minut.
- Gele smo nato previdno prenesli na ploščo optičnega čitalca in nastale slike arhivirali.
- Gele smo shranili v fiksacijskem pufru pri 4 °C.

2. Barvanje z barvilm Coomassie

- Po končani drugi dimenziji smo posamezen gel sprostili s steklenih plošč v banjicah z 200 ml fiksacijskega pufra (40 % metanol, 10 % ocetna kislina), tako da je le-ta prekril gel. Fiksacija je potekala eno uro med rahlim stresanjem na orbitalnem stresalniku.
- Fiksacijski pufer smo odlili in prilili 250 ml barvila Coomassie (50 % metanol, 10 % ocetna kislina, 0,05 % Coomassie modro) v vsako banjico. Banjice smo ovili z

gospodinjsko folijo in barvali preko noči ob nežnem stresanju na orbitalnem stresalniku.

- Naslednji dan smo gele prenesli v čiste banjice in jih trikrat sprali s 500 ml tople destilirane vode, ki smo jo ogreli na 45 – 55 °C.
- Nato smo gele spirali dvakrat po 30 minut z 250 ml tople 5 % ocetne kisline.
- Nadaljevali smo s spiranjem s toplo destilirano vodo vsaj še petkrat, da smo čim bolje razbarvali ozadje gela.
- Gele smo nato previdno prenesli na ploščo optičnega čitalca in nastale slike arhivirali.
- Gele smo shranili v fiksacijskem pufru pri 4 °C.

### 3.2.6.4 Izrezovanje proteinskih lis

Gele s proteini celične stene posamezne vrste gliv smo primerjali med seboj po slanostih. S skalpelom smo izrezali lise, ki so se pri nižji in višji slanosti razlikovale po velikosti in intenziteti ter odsotnosti oziroma prisotnosti lise pri eni slanosti. Proteine smo poslali na analizo z masno spektroskopijo v Biozentrum Univerze v Baslu v Švici.

### 3.2.6.5 Masna spektroskopija proteinov celične stene

Potek tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (»liquid chromatography tandem MS“ ali LC/MS/MS) je opisan v članku Vaupotič et al., 2008. Metoda je uporabna za detekcijo in identifikacijo komponent v kompleksnih mešanicah vzorca. Proteine se najprej s tripsinom proteolitično razgradi, denaturira z ureo in stabilizira cisteinske ostanke, pred analizo pa se jih še dodatno očisti s tekočinsko kromatografijo (LC). Sledi LC/MS s tandemsko MS (LC/MS/MS), ki identificira peptide (»peptide mass fingerprinting«). MS/MS spektre se pregleda in primerja s podatkovno banko (Graves in Haystead, 2002; Kim et al., 2007).

### 3.3 GOJIŠČA, RAZTOPINE IN PUFRI

#### 3.3.1 Gojišča

a) Priprava tekočih gojišč YNB s kazamino kislinami

YNB (Kvasno gojišče z dušikovo bazo - Yeast Nitrogen Base Medium) (Qbiogene)

CSM (Complete Supplement Mixture)	0,8 g
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1,7 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g
Glukoza	20 g
NaCl	X g (m/V) *
dH <sub>2</sub> O ozziroma MilliQ	do 1000 ml

\* dodamo ustrezno količino NaCl glede na želeno slanost gojišča, kot prikazuje spodnji seznam:

<u>Odstotek NaCl v gojišču YNB (m/V)</u>	<u>Dodana količina NaCl v 1000 ml gojišča</u>
• 5 %	50 g
• 15 %	150 g
• 20 %	200 g
• 25 %	250 g

pH gojišča smo umerili na 7,0 z dodajanjem raztopine KOH. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri 121 °C. Na sobno temperaturo ohlajena gojišča smo do uporabe shranili pri 4 °C.

Za pripravo tekočih gojišč YNB za meritve ionov in kompatibilnih topljencev smo namesto destilirane vode uporabili vodo MilliQ, da smo se izognili prisotnosti nedefiniranih ionov. Pri pripravi tekočih gojišč YNB za ostale poskuse (določanje rastne krivulje, določanje velikosti celic in skupkov celic, izolacija proteinov) smo uporabljali destilirano vodo.

## b) Priprava poševnih gojišč MY50G

MY50G (Sladni kvasni agar s 50 % glukoze - Malt Yeast 50 % Glucose agar) (Pitt in Hocking, 1997)

Malt Extract	10 g
Yeast Extract	2,5 g
Agar	10 g
Glukoza	250 g
dH <sub>2</sub> O	do 500 ml

Avtoklaviranje je potekalo 30 minut pri 100 °C. Po končani sterilizaciji smo epruvete položili vodoravno na nosilec, tako da je imelo strjeno gojišče poševno površino.

### 3.3.2 Raztopine in pufri

#### 3.3.2.1 Raztopine pri pripravi vzorcev za meritve vsebnosti ionov

##### 1) Raztopina za spiranje celic pri pripravi vzorcev za meritve vsebnosti ionov

V manjšem volumnu vode MilliQ smo raztopili MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, nato pa med segrevanjem dodajali sorbitol. Nato smo prostornino raztopine dopolnili z vodo MilliQ do 500 ml. Prelili smo jo v čisto plastično puhalko in jo pred uporabo ohladili na 4 °C.

Preglednica 5: Izračunane koncentracije NaCl in sorbitola za preiskovane slanosti.

Odstotek NaCl (%)	5	15	20	25
Koncentracija NaCl (g/l)	50	150	200	250
Molarnost NaCl (mol/l)	0,856	2,568	3,425	4,28
Molarnost sorbitola (mol/l)	1,712	5,136	6,848	8,56
Koncentracija sorbitola (g/l)	311,93	624	624	624
Odstotek sorbitola (%)	31,2	62,4	62,4	62,4

$$M(\text{NaCl}) = 58,4 \text{ g/mol}, M(\text{sorbitol}) = 182,2 \text{ g/mol}$$

Preglednica 6: Sestava raztopin za spiranje celic pri pripravi vzorcev za meritve ionov

Odstotek NaCl (%)	5	15	20	25
Masa MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (g)	2,03	2,03	2,03	2,03
Masa sorbitola (g)	155,97	311,93	311,93	311,93
Totalni volumen raztopine (ml)	500	500	500	500

2) Tekočina za ekstrakcijo vzorcev za meritve ionov

Pripravili smo jo na enak način, kot zgoraj opisano raztopino. Receptura je sledeča:

4 % HCl (114,28 ml 35 % HCl)

2,03 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,01 M)

Z MilliQ smo raztopino dopolnili do 1000 ml.

### 3.3.2.2 Raztopine pri pripravi vzorcev za meritve vsebnosti kompatibilnih topljencev

1) 10-kratna založna raztopina tekočine za spiranje celic

Posebej smo pripravili raztopine 1, 2 in 3 in jih po avtoklaviranju sterilno združili v infuzijsko steklenico.

Raztopina 1:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
NaCl	1 g
dH <sub>2</sub> O	do 800 ml

Raztopina 2:

MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	10,233 g
dH <sub>2</sub> O	do 100 ml

Raztopina 3:

CaCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,324 g
dH <sub>2</sub> O	do 100 ml

- 2) Tekočina za spiranje celic pri pripravi vzorcev za meritve vsebnosti kompatibilnih topljencev

Pripravili smo vsakokrat svežo raztopino iz 10-kratne založne raztopine, NaCl in destilirane vode.

Založna raztopina (10x)	100 ml
NaCl	5, 15, 20 in 25 % (w/v)- enako kot v gojišču
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

Sestava tekočine za spiranje celic pri pripravi vzorcev za meritve kompatibilnih topljencev:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
NaCl	5, 15, 20 in 25 % (m/V) – enako kot v gojišču
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

### 3.3.2.3 Raztopine za izolacijo in analizo proteinov celične stene in citosola

#### 1) Spiralni pufer

10 mM Tris HCl, pH=7.5, 25°C

Trizma-HCl	1,27 g
Trizma-Baza	0,236 g
MilliQ	do 1000 ml

#### 2) Homogenizacijski pufer

50 mM Tris HCl, pH= 7.5, 2 mM EDTA, 0.6 M sorbitol

Tris-HCl	1,270 g
Tris-Baza	0,236 g
EDTA	0,149 g
Sorbitol	21,86 g
MilliQ	do 200 ml

Tik pred uporabo smo dodali ustrezni volumen PIC (proteazni inhibitorski koktajl) glede na težo biomase (1 ml PIC ustreza 20 g biomase).

#### 3) Raztopina kalcijevega klorida

CaCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,94 g
MilliQ	do 10 ml

#### 4) Pufer za resuspendiranje celic

10 mM Tris HCl, pH= 7.5

Tris-HCl	0,254 g
Tris-Baza	0,0472g
MilliQ	do 200 ml

Tik pred uporabo smo dodali ustrezni volumen PIC.

## 5) 1 M raztopina NaCl

NaCl 5,844 g

MilliQ do 100 ml

Tik pred uporabo smo dodali ustrezni volumen PIC.

## 6) Pufer za ekstrakcijo proteinov iz celične stene

50 mM Tris HCl, pH= 7.8, 2 % SDS, 100 mM EDTA, 40 mM β-merkaptoetanol

Tris-HCl 1,064 g

Tris-Baza 0,3942 g

SDS 4,0 g

EDTA 7,445 g

β-merkaptoetanol 0,521 ml

MilliQ do 200 ml

Tik pred uporabo smo dodali ustrezni volumen PIC.

## 7) Raztopina barvila Coomassie Blue G

Coomassie Blue G 2 ml

MilliQ 8 ml

## 8) Pufer za lizo NLB (Native Lysis Buffer)

100 mM Tris HCl, pH = 8.5, 2 mM EDTA, 1 % NP40

Tris-HCl, pH 8.5 10 ml

EDTA 0,074 g

NP40 1 g

MilliQ do 100 ml

## 9) Rehidracijski pufer

8 M urea, 2 % CHAPS, 0,002 % bromofenol modro

Urea	12 g
CHAPS	0,5 g
Bromofenol modro	50 µl
MilliQ	do 25 ml

Pred uporabo smo dodali DTT in Pharmalyte.

## 10) Ekvilibracijski pufer

50 mM Tris HCl, pH= 8.8, 6 M urea, 2 % SDS, 30 % glicerol, 0,002 % bromofenol modro

Tris-HCl, pH 8.8	10 ml
Urea	72,07 g
Glicerol (100%)	60 ml
SDS	4,0 g
Bromofenol modro	400 µl 1 % raztopine
MilliQ	do 200 ml

## 11) Ekvilibracijski pufer z ditiotreitolom (DTT)

V 10 ml ekvilibracijskega pufra smo tik pred uporabo raztopili 100 mg DTT.

## 12) Ekvilibracijski pufer z jodoacetamidom (IAA)

V 10 ml ekvilibracijskega pufra smo tik pred uporabo raztopili 250 mg IAA.

## 13) Založna raztopina bromofenol modrega

Bromofenol modro	100 mg
Tris baza	60 mg
MilliQ	do 10 ml

## 14) Pufer za pripravo gela

1,5 M Tris HCl, pH 8.8

Tris baza	181,7 g
MilliQ	750 ml
HCl	uravnanje pH na 8.8
MilliQ	do 1000 ml

## 15) SDS elektroforetski pufer

25 mM Tris HCl, pH=8.3, 1,92 M glicin, 0,2 % SDS

Tris baza	30,3 g
Glicin	144 g
SDS	20 g
MilliQ	do 10 l

## 16) 10 % raztopina SDS

SDS	5,0 g
MilliQ	do 50 ml

## 17) 10 % raztopina amonijevega persulfata (APS)

APS	0,1 g
MilliQ	do 1 ml

## 18) 0,5 % Agarozna raztopina

SDS elektroforetski pufer	100 ml
Agaroza	0,5 g
Bromofenol modro	200 µl 1% raztopine

Vse sestavine smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici.

## 19) Fiksacijski pufer

50 % metanol, 12 % ocetna kislina, 0,05 % formalin, volumen = 200 ml

Metanol	100 ml
Oacetna kislina	24 ml
Formalin (37%)	300 µl
MilliQ	76 ml

## 20) Spiralni pufer

35 % Etanol, volumen = 200 ml

Etanol (96%)	72,9 ml
MilliQ	127,1 ml

## 21) Senzitizacijski pufer

0,02 % natrijev tiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), volumen = 200 ml

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,2 ml 20% raztopine
MilliQ	200 ml

Pripravili smo si 20 % raztopino  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  in jo pred fotooksidacijo zaščitili z aluminijasto folijo.

## 22) Raztopina srebrovega nitrata

0,2 % srebrov nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), 0,076 % formaldehid, volumen = 200 ml

$\text{AgNO}_3$	0,4 g
Formalin (37%)	152 µl
MilliQ	200 ml

## 23) Razvijalec

6 % natrijev karbonat, 0,05 % formaldehid, 0,0004 % natrijev tiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), volumen = 400 ml

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	24 g
Formalin (37 %)	200 $\mu\text{l}$
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	8 $\mu\text{l}$ 20 % raztopine
MilliQ	392 ml

## 24) Pufer za zaustavitev razvijanja (Stop Solution/ Stop- raztopina)

50 % metanol, 12 % ocetna kislina, volumen = 200 ml

Metanol	100 ml
Oacetna kislina	24 ml
MilliQ	76 ml

## 25) Fiksacijski pufer za barvanje gelov z barvilm Coomassie

40 % metanol, 10 % ocetna kislina

Metanol	400 ml
Oacetna kislina	100 ml
MilliQ	do 1000 ml

## 26) 5 % raztopina ocetne kisline

Oacetna kislina	50 ml
MilliQ	do 1000 ml

## 27) Barvilo Coomassie za barvanje gelov

50 % metanol, 10 % ocetna kislina, 0,05 % Coomassie modro

Metanol	500 ml
Oacetna kislina	100 ml
Coomassie modro	0,5 g
MilliQ	do 1000 ml

### 3.4 KEMIKALIJE, PRIBOR IN APARATURE

#### 3.4.1 Kemikalije

Preglednica 7: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla.

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
(NH) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Nemčija
Aceton	Merck, Darmstadt, Nemčija
Agar agar	Biolife, Milano, Italija
Agaroza	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
APS (amonijev persulfat)	Serva Feinbiochemica Gmb&Co., Heidelberg, Nemčija
Bromofenol modro	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
BSA standard	BioLabs, New England, ZDA
CaCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Nemčija
CHAPS	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Nemčija
Coomassie BlueG Roti® -Nanoquant	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Nemčija
CSM (Complete Supplement Mixture)	Q-Biogene, Bio 101 Systems, Illkirch , Francija
DTT, 20x reducing Agent	Fermentas, Live Science, Litva
EDTA	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Etanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Nemčija
Formaldehid (37%)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Glicerol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Glicin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Nemčija
Glukoza (D(+)-Glucose Anhydrous)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
HCl	Kemika, Zagreb, Hrvatska
IAA	Merck, Darmstadt, Nemčija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kemika, Zagreb, Hrvatska
KOH	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Kvasni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
Mešanica akril amida in biasakrilamida, Rothiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Nemčija
Metanol	Merck, Darmstadt, Nemčija
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Nemčija
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Nemčija
Mineralno olje	GE Healthcare (prej: Amersham Bioscience) ZDA
NaCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev acetat	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev karbonat	Merck, Darmstadt, Nemčija

Natrijev tiosulfat	Merck, Darmstadt, Nemčija
NP-40	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Oacetna kislina	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Nemčija
Pharmalyte	GE Healthcare (prej: Amersham Bioscience) ZDA
PIC (Protease Inhibitor Cocktail)	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
SDS	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Sladni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
Sorbitol	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Srebrov nitrat	Merck, Darmstadt, Nemčija
TEMED	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Tris baza	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Tris HCl	Sigma Chemical C., St.Louis, Mo., ZDA
Urea	Serva Feinbiochemica Gmb&Co., Heidelberg, Nemčija
YNB (Yeast Nitrogen Base Extract)	Q-Biogene, Bio 101 Systems, Illkirch, Francija
β-merkaptetoanol	Merck, Darmstadt, Nemčija

---

### 3.4.2 Laboratorijski pribor in material

Pri raziskovalnem delu smo uporabili naslednji laboratorijski pribor:

- Banjice za elektroforezne gele, plastične
- Centrifugirke;
- Cepilne zanke;
- Čaše (50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml);
- Epruvete, steklene;
- Epruvete s konusnim dnom in pokrovčkom na navoje, plastične (50 ml in 14 ml);
- Filtrirni lijak (Buchnerjev lij), porcelanasti;
- Glavniki za pripravo gela;
- Infuzijske stekleničke (250 ml, 500 ml, 1000 ml);
- Laboratorijske rokavice (nepudrane lateks rokavice in nitrilne rokavice);
- Merilni valji;
- Mikrocentrifugirke Eppendorf, Hamburg, Nemčija (1500 µl);
- Nastavki za pipete Eppendorf, Hamburg, Nemčija;
- Nitrocelulozni filtri (0,8µm, AAWP, 25 mm in 0,45µm, IPKG, 47 mm) Millipore, Massachusetts, ZDA
- Nosilci za IPG trakove, porcelanasti, Amersham;
- Petrijevke, plastične Golias, Slovenija (premer 70 in 90 mm);
- Petrijevke, steklene

- Pincete;
- Polavtomatske pipete Eppendorf, Hamburg, Nemčija (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl);
- Posodice za dismembranacijo, kovinske;
- Puhalke (500 ml)
- Sistem za vakuumsko filtriranje, Millipore (veliki in mali)
- Skalpel;
- Spatule;
- Steklene plošče z distančniki za pripravo elektroforeznih gelov, Amersham
- Stekleni nastavki za pipete;
- Termoizolacijska posoda.

### 3.4.3 Laboratorijske aparature

Preglednica 8: Seznam uporabljenih aparatur s proizvajalcem in državo porekla.

Aparatura	Proizvajalec in poreklo
Aparat za izoelektrično fokusiranje (IEF) Ettan™ IPGphore™ II	GE Healthcare, Amersham Bioscience, ZDA
Atomski absorpcijski spektrofotometer SpectrAA-100/200	Varian, ZDA
Avtoklav A-63C	Kambič, Semič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvatska
Centrifuga	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga Sorvall Superspeed RC2-B	Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, ZDA
Digestorij Variolab Mobilien W90	Waldner, Wangen, Nemčija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Tokio, Japonska
Dismembranator	Retsch MM301, Haan, Nemčija
Električni grelnik	Tehnica, Železniki, Slovenija
Elektroforezna enota Ettan™ DALTsix	GE Healthcare, Amersham Bioscience, ZDA
Enota za kroženje pufra pri elektroforezi	GE Healthcare, Amersham Bioscience, ZDA
HPLC, Spectra System	Thermo Separation Products, New Jersey, ZDA
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Liofilizator Christ Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Nemčija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehnica, Železniki, Slovenija
Masni spektrometer	
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokio, Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Optični čitalec ImageScanner	GE Healthcare, Amersham Bioscience, ZDA
pH meter Metrohm 713	Tehnica, Železniki, Slovenija
Spektrofotometer (UV/VIS)	Perkin Elmer, Waltham, ZDA
Stresalnik Innova® 44	New Brunswick Scientific
Tehtnica ET- 1111	Tehnica, Železniki, Slovenija
Tehtnica EXACTA 310 EB	Tehnica, Železniki, Slovenija
Usmernik Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, Amersham Bioscience, ZDA
Vibracijski mešalnik	Tehnica, Železniki, Slovenija

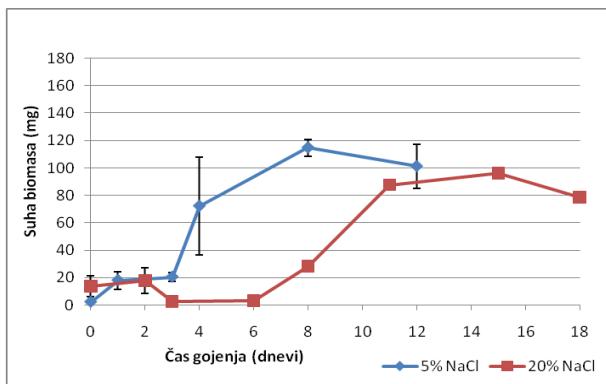
## 4 REZULTATI

Raziskovalno delo je potekalo od marca 2006 do avgusta 2008. Sprva smo izdelali rastne krivulje za vrste *W. ichthyophaga*, *W. muriae* in *W. sebi* pri dveh slanostih. Nato smo pripravili preliminarne vzorce za meritve vsebnosti kationov in kompatibilnih topljencev v logaritemski in stacionarni fazi rasti pri vrsti *W. ichthyophaga*. Meritve vsebnosti kationov so bile opravljene v Laboratoriju za agrikulturno mikrobiologijo Oddelka za mikrobiologijo Univerze v Cordobi z metodo atomske absorpcijske spektroskopije, meritve vsebnosti kompatibilnih topljencev pa na Inštitutu za mikrobiologijo in biotehnologijo Univerze Friedrich-Wilhelms v Bonnu z metodo visokotlačne tekočinske kromatografije vezane z masno spektroskopijo. Glede na preliminarne rezultate meritev vsebnosti kationov in kompatibilnih topljencev pri *W. ichthyophaga* smo preverili morebitne poškodbe celic med pripravo vzorcev ter optimizirali postopek priprave vzorcev za vse tri vrste. Nato smo za vse tri vrste v logaritemski fazi rasti pripravili vzorce za analizo prisotnosti in količine kompatibilnih topljencev in kationov.

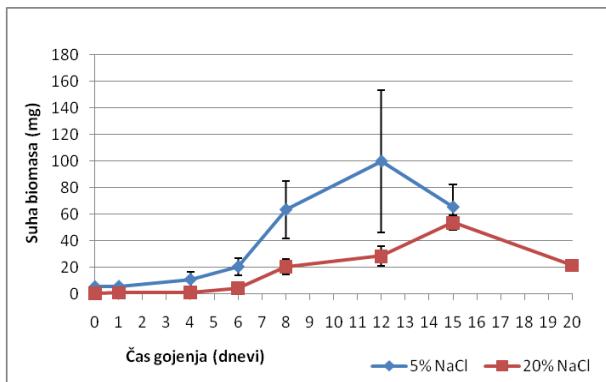
Proteomske analize celične stene in citosola smo opravili le za vrsto *W. ichthyophaga* pri dveh izbranih slanostih ter za glivo *Hortaea werneckii*, s katero smo primerjali rezultate. Metodo dvodimenzionalne gelske elektroforeze smo izvedli na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Identifikacija proteinov celične stene je bila opravljena na Inštitutu Biozentrum v Baslu.

#### 4.1 RASTNE KRIVULJE GLIV RODU *Wallemia*

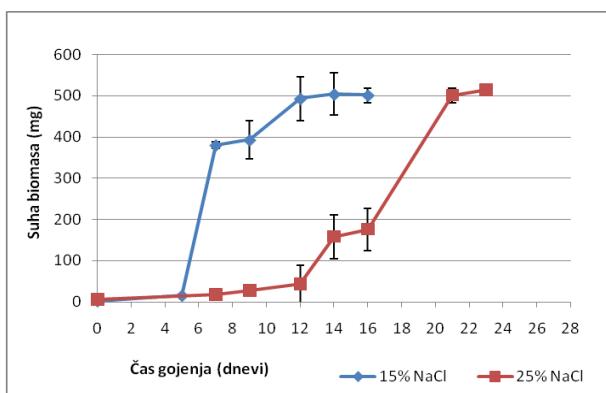
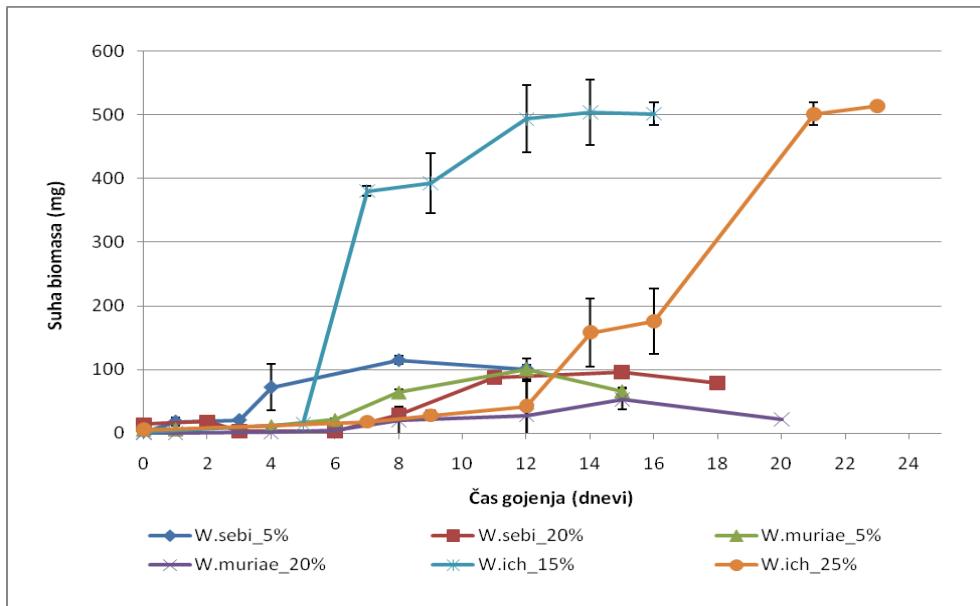
Rastne krivulje smo določili z zaporednim vzorčenjem suhe biomase celotne vsebine kulture ene Erlenmeyerjeve steklenice v dveh vzporednicah.



Slika 8: Rastna krivulja glive *W. sebi* v tekočem gojišču YNB s 5 % in 20 % (m/V) NaCl.



Slika 9: Rastna krivulja glive *W. muriae* v tekočem gojišču YNB s 5 % in 20 % (m/V) NaCl.

Slika 10: Rastna krivulja gline *W. ichthyophaga* v tekočem gojišču YNB s 15 % in 25 % (m/V) NaCl.Slika 11: Primerjava rastnih krivulj gliv *Wallemia* spp. pri nizki in visoki slanosti tekočega gojišča YNB.

## 4.2 VELIKOSTI CELIC IN VELIKOSTI SKUPKOV GLIV RODU *Wallemia*

### 4.2.1 Velikosti in oblike celic

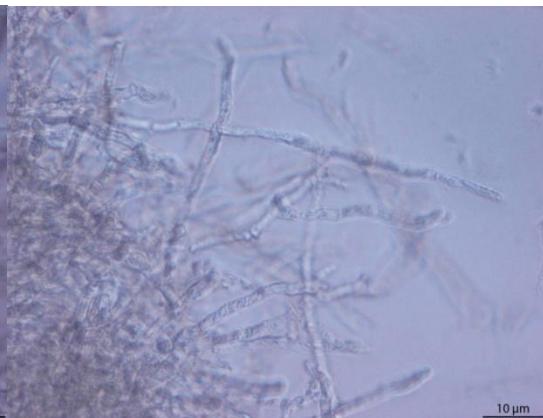
Celice *W. sebi* in *W. muriae* so cilindrične oblike (sliki 12 in 13). Povprečno merijo 20 µm in so široke 3 µm. Celice *W. ichthyophaga* (sliki 14 in 15) so nepravilne izodiametrične oblike z dimenzijami med 8 in 10 µm. Podrobni rezultati so prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9: Povprečna velikost celic vrst rodov *Wallemia* pri nizki in visoki slanosti.

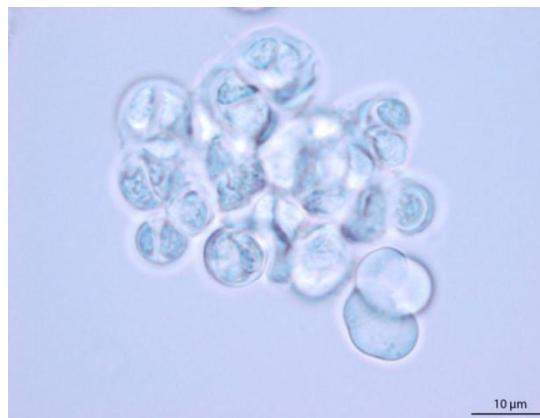
	<i>W. sebi</i>		<i>W. muriae</i>		<i>W. ichthyophaga</i>	
	5 % NaCl	20 % NaCl	5 % NaCl	20 % NaCl	15 % NaCl	25 % NaCl
<b>Dolžina celice (µm) ± STDEV</b>	19,7 ± 4,7	18,0 ± 8,8	20,3 ± 5,2	19,5 ± 7,6	9,6 ± 1,7	9,4 ± 1,4
<b>Širina celice (µm) ± STDEV</b>	3,1 ± 0,2	3,9 ± 0,4	3,2 ± 0,3	3,8 ± 0,5	8,3 ± 1,4	7,8 ± 1,5



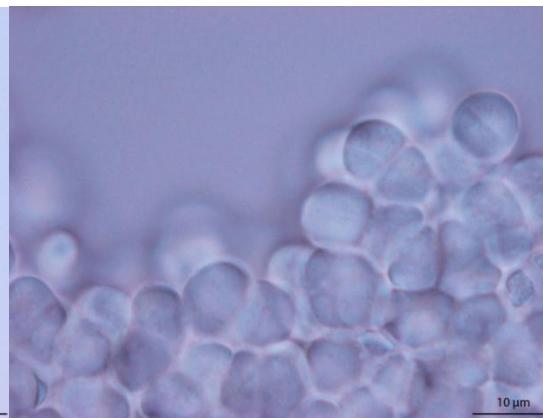
Slika 12: Mikroskopski posnetek *W. sebi* (YNB s 5 % NaCl, logaritemska faza rasti).



Slika 13: Mikroskopski posnetek *W. sebi* (YNB z 20 % NaCl, logaritemska faza rasti).



Slika 14: Mikroskopski posnetek *W. ichthyophaga* (YNB s 15 % NaCl, logaritemska faza rasti).



Slika 15: Mikroskopski posnetek *W. ichthyophaga* (YNB s 25 % NaCl, logaritemska faza rasti).

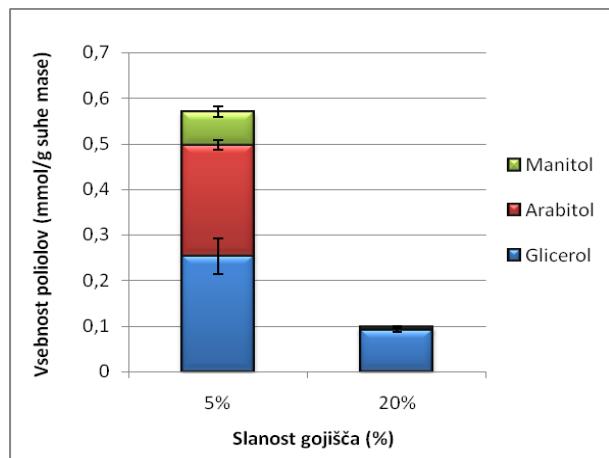
#### 4.2.2 Velikosti in oblike skupkov

Skupki celic *W. sebi* in *W. muriae* so v bolj ali manj pravilne kroglice prepletene hife, ki v premeru merijo od 1 do 2 mm pri 5 % NaCl v gojišču YNB ter 2 do 3 mm pri 20 % NaCl v gojišču YNB.

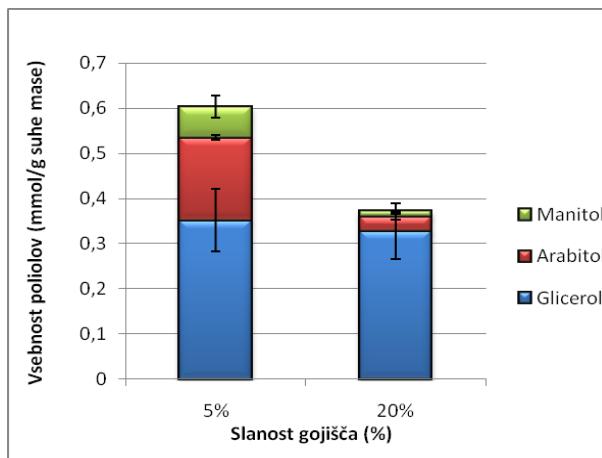
Skupki celic *W. ichthyophaga* so nepravilnih oblik, velikosti okrog 100 µm do okrog 350 µm v premeru. Največkrat smo pri višji slanosti opazili večje skupke, kar se je pokazalo tudi pri meritvah premora skupkov dveh vzporednih kultur iste slanosti. Pri 15 % NaCl v gojišču YNB smo izmerili skupke povprečno velike od 110 µm do 130 µm ( $\pm 72$  µm) ter pri 25 % NaCl okrog 345 µm ( $\pm 100$  µm). Napaka meritve je velika zaradi variabilnosti v velikosti skupkov.

### 4.3 VSEBNOST KOMPATIBILNIH TOPLJENCEV V CELICAH GLIV RODU *Wallemia*

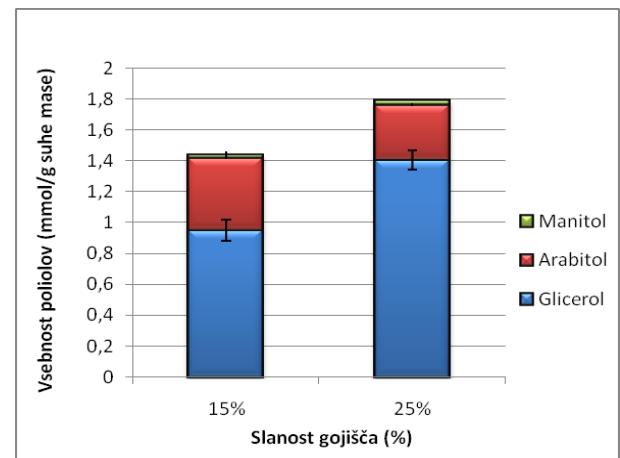
Celice smo poželi v logaritemski fazi rasti v treh vzporednicah za vsako slanost. Vsebnost kompatibilnih topljencev (poliolov in aminokislin) je bila analizirana s HPLC in z masno spektroskopijo. V vseh treh vrstah gliv rodu *Wallemia* so našli le tri vrste poliolov (glicerol, arabitol in manitol). Rezultati so prikazani na slikah 16, 17, 18 in 19.



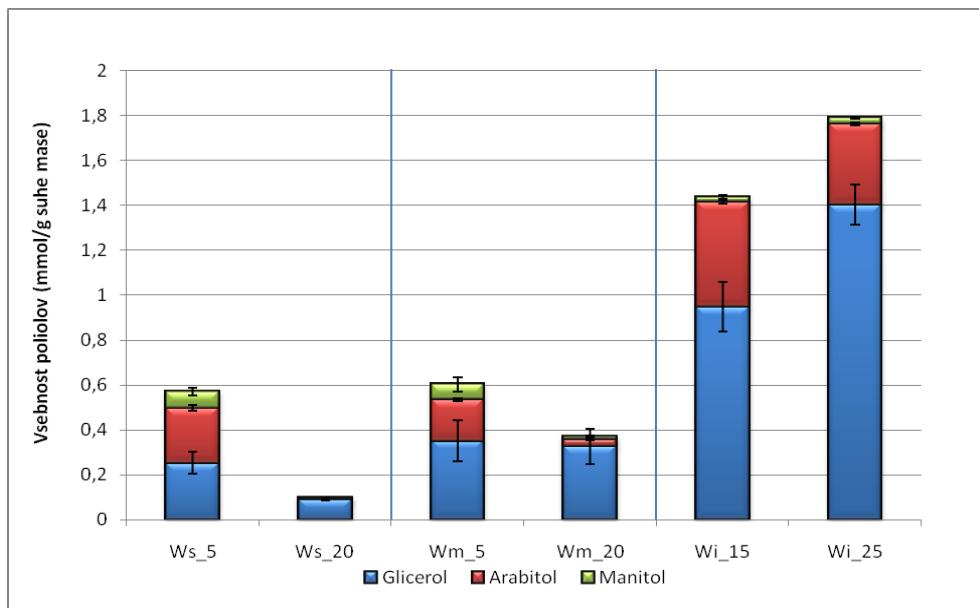
Slika 16: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah *W. sebi*, gojenih pri 5 % in 20 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB.



Slika 17: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah *W. muriae* gojenih pri 5 % in 20 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB.



Slika 18: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah *W. ichthyophaga*, gojeni pri 15 % in 25 % (m/V) NaCl v tekočem gojišču YNB.



Slika 19: Celokupna vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah vrst rodu *Wallemia* pri dveh izbranih slanostih.

Legenda:

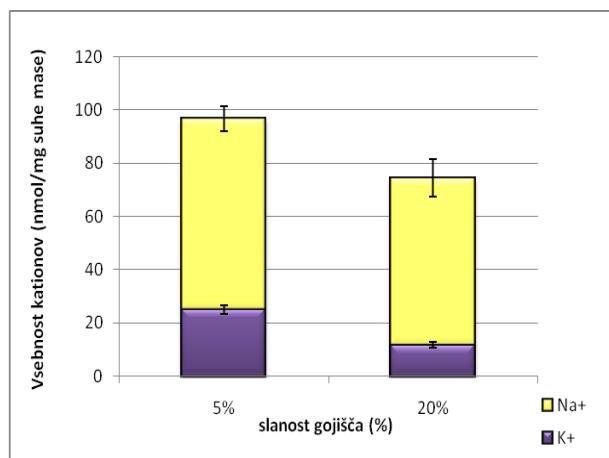
Ws\_5 in Ws\_20: *W. sebi* pri 5 % in 20 % NaCl;

Wm\_5 in Wm\_20: *W. muriae* pri 5 % in 20 % NaCl;

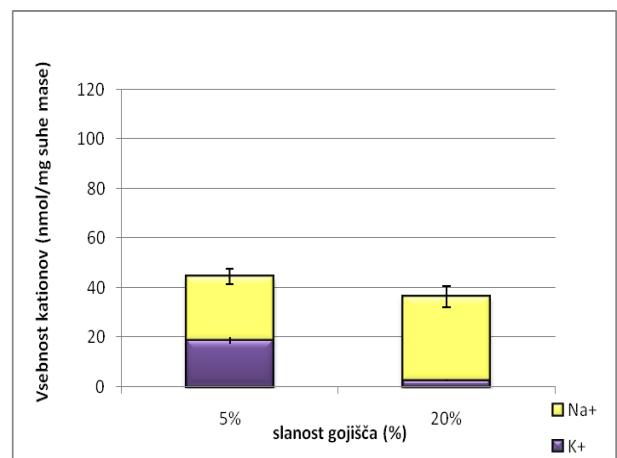
Wi\_15 in Wi25: *W. ichthyophaga* pri 15 % in 25 % NaCl.

#### 4.4 VSEBNOST KATIONOV V CELICAH GLIV RODU *Wallemia*

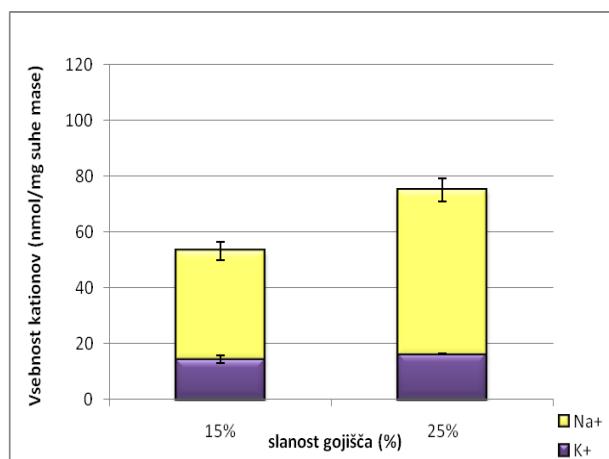
Celice smo poželi v logaritemski fazi rasti v treh vzporednicah za vsako slanost. Vsebnost  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  je bila analizirana z atomsko absorpcijsko spektroskopijo.



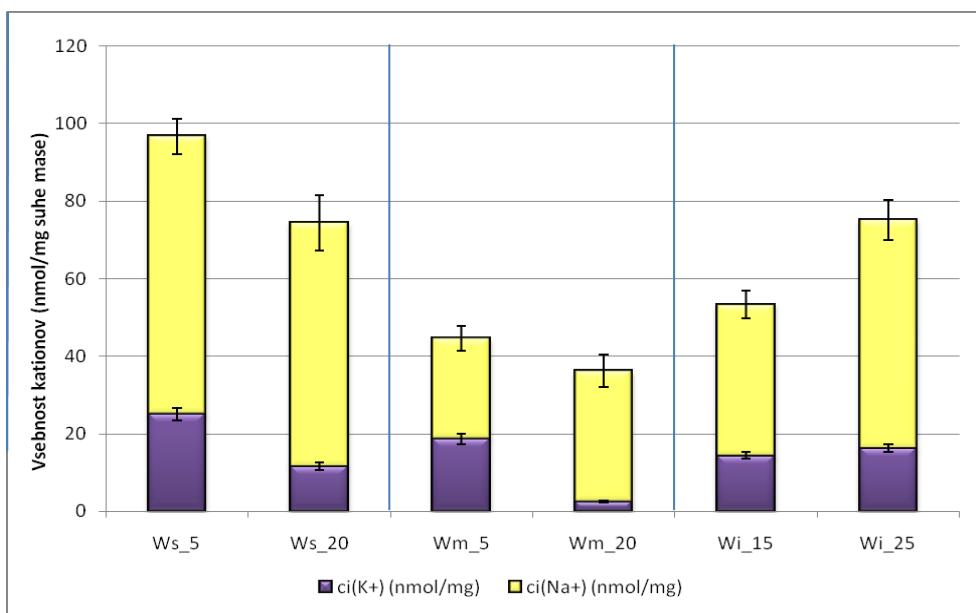
Slika 20: Celokupna vsebnost kationov v celicah *W. sebi*, gojenih pri 5 % in 20 % (m/V)  $\text{NaCl}$  v tekočem gojišču YNB.



Slika 21: Celokupna vsebnost kationov v celicah *W. muriae*, gojenih pri 5 % in 20 % (m/V)  $\text{NaCl}$  v tekočem gojišču YNB.



Slika 22: Celokupna vsebnost kationov v celicah *W. ichthyophaga*, gojenih pri 15 % in 25 % (m/V)  $\text{NaCl}$  v tekočem gojišču YNB.



Slika 23: Celokupna vsebnost kationov v celicah vrst rodu *Wallemia* pri nižji in višji slanosti.

Legenda:

Ws\_5 in Ws\_20: *W. sebi* pri 5 % in 20 % NaCl;

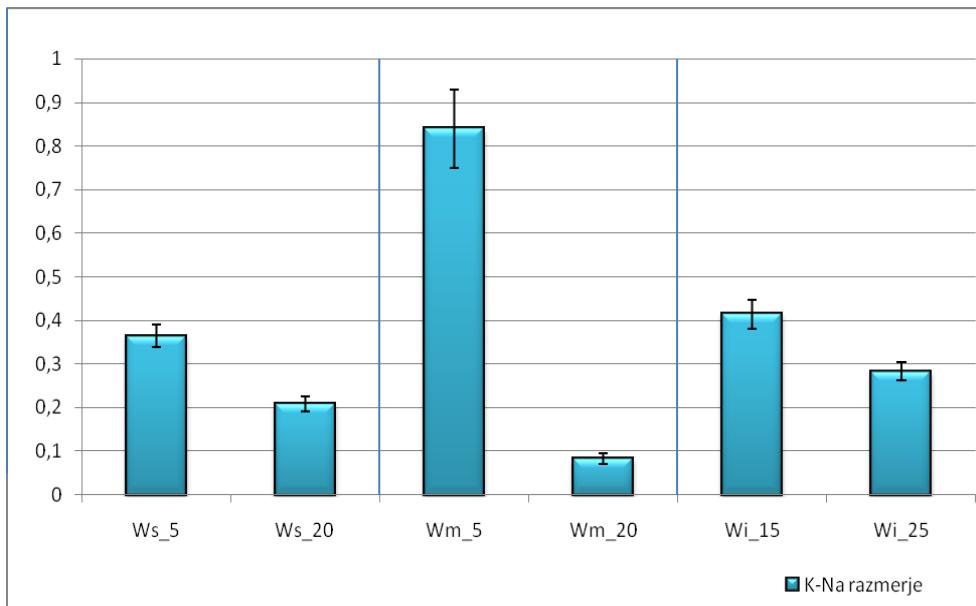
Wm\_5 in Wm\_20: *W. muriae* pri 5 % in 20 % NaCl;

Wi\_15 in Wi\_25: *W. ichthyophaga* pri 15 % in 25 % NaCl.

#### 4.4.1 Razmerje med znotrajceličnim $K^+$ in $Na^+$ pri vrstah rodu *Wallemia*

Preglednica 10: Razmerje med znotrajceličnim  $K^+$  in  $Na^+$  pri vrstah rodu *Wallemia* pri dveh izbranih slanostih.

Koncentracija NaCl v gojišču	Razmerje $K^+/Na^+$		
	<i>W. sebi</i>	<i>W. muriae</i>	<i>W. ichthyophaga</i>
5%	0,364	0,84	/
15%	/	/	0,414
20%	0,208	0,083	/
25%	/	/	0,283



Slika 24: Razmerje med znotrajcelično vsebnostjo  $K^+$  in  $Na^+$  pri vrstah rodu *Wallemia* pri dveh izbranih slanostih.

Legenda:

Ws\_5 in Ws\_20: *W. sebi* pri 5 % in 20 % NaCl;

Wm\_5 in Wm\_20: *W. muriae* pri 5 % in 20 % NaCl;

Wi\_15 in Wi\_25: *W. ichthyophaga* pri 15 % in 25 % NaCl.

## 4.5 PROTEOMIKA CELIČNE STENE *W. ichthyophaga* IN *H. werneckii*

Izvedli smo izolacijo, ločitev in analizo proteinov celične stene in citosola *H. werneckii* in *W. ichthyophaga* pri dveh izbranih slanostih.

### 4.5.1 Izolirane koncentracije proteinov

Preglednica 11: Izolirane koncentracije proteinov celične stene in citosola vrste *W. ichthyophaga* in *H. werneckii*.

	<i>W. ichthyophaga</i>		<i>H. werneckii</i>	
	15 % NaCl	25 % NaCl	10 % NaCl	25 % NaCl
Koncentracija proteinov celične stene ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0,54	0,42	2,2	0,85
Koncentracija proteinov citosola ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0,56	1,07	2,01	1,76

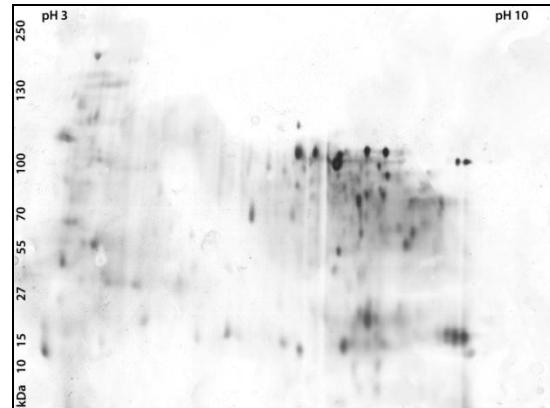
### 4.5.2 Ločitev proteinov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo

Ločitev proteinov citosola obeh vrst v dveh dimenzijah (po izoelektrični točki in molekulske masi) je pokazala preveliko število proteinskih lis, ki pa niso bile dovolj očitne in kontrastne za nadaljnjo analizo. Po barvanju s srebrovim nitratom smo dobili svetlo sivo sliko nejasnih proteinskih lis. V nadaljevanju smo se zato osredotočili le na proteine celične stene.

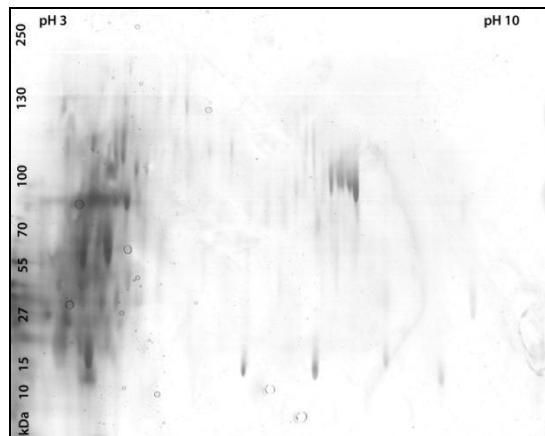
Spodnje slike prikazujejo ločitev proteinov celične stene *H. werneckii* (slika 25 in 26) in *W. ichthyophaga* (slika 27 in 28), ki smo kontrastirali s srebrovim nitratom. Vsaka lisa predstavlja eno vrsto proteina.



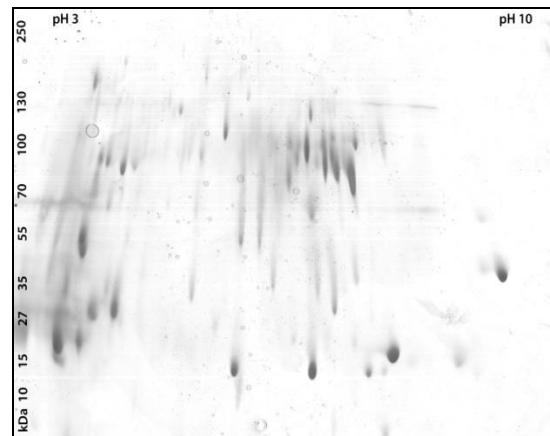
Slika 25: Slika gela 2DEF proteinov celične stene *H. werneckii* pri 10 % NaCl v gojišču.



Slika 26: Slika gela 2DEF proteinov celične stene *H. werneckii* pri 25 % NaCl v gojišču.



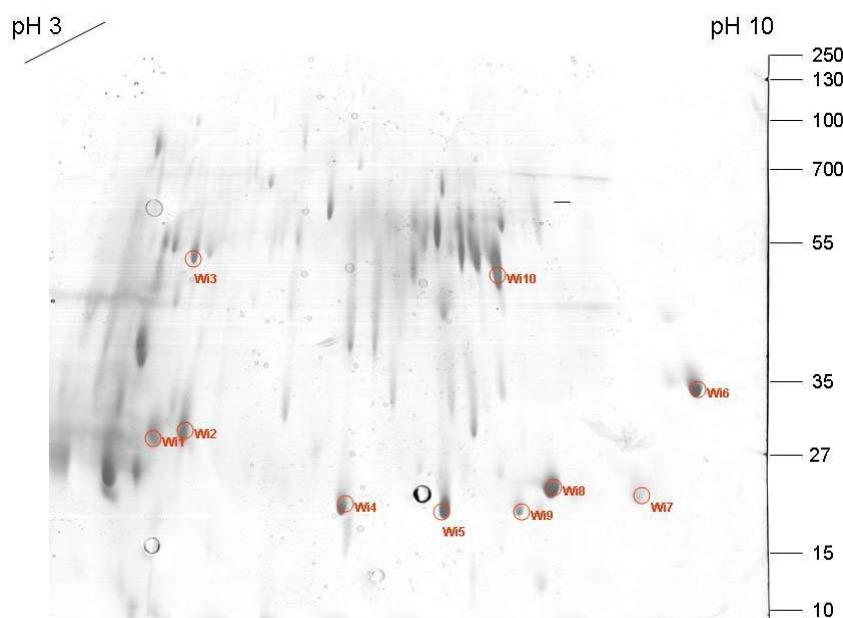
Slika 27: Slika gela 2DEF proteinov celične stene *W. ichthyophaga* pri 15 % NaCl v gojišču.



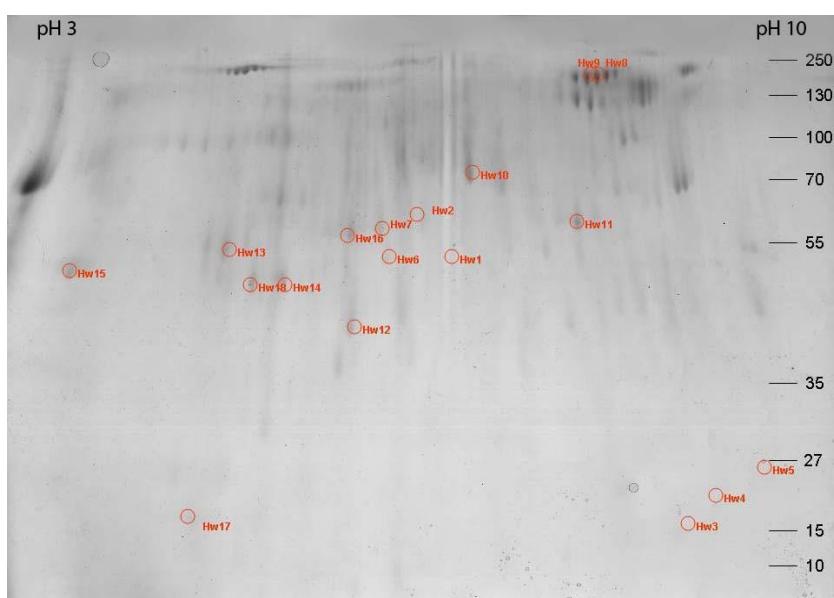
Slika 28: Slika gela 2DEF proteinov celične stene *W. ichthyophaga* pri 25 % NaCl v gojišču.

#### 4.5.3 Analiza proteinov celične stene *W. ichthyophaga* in *H. werneckii*

Spodnji slike prikazujeta, katere lise smo pri posamezni vrsti izrezali iz gelov, barvanih z barvilom Coomassie. Lise so označene le na gelu s proteinimi višje slanosti. Navpično ob slikah je velikostna lestvica proteinov v kilo Daltonih (kDa), vodoravno pa razpon pH.



Slika 29. Slika gela 2DEF proteinov celične stene *W. ichthyophaga* pri 25 % NaCl v gojišču z označenimi izrezanimi proteinskimi lisami.



Slika 30: Slika gela 2DEF proteinov celične stene *H. werneckii* pri 25 % NaCl v gojišču z označenimi izrezanimi proteinskimi lisami.

Preglednica 12: Seznam analiziranih proteinov celične stene *W. ichthyophaga*

Oznaka proteinske lise	Identificiran protein	Regulacija izražanja proteina	
		15 % NaCl	25 % NaCl
Wi 1	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, izoencim 3	znižano	povišano
Wi 2	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, izoencim 3	znižano	povišano
Wi 3	Cdc19p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	znižano	povišano
Wi 4	glikozil transferaza [ <i>Symbiobacterium thermophilum</i> ]	znižano	povišano
Wi 5	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, izoencim 2	znižano	povišano
Wi 6	neidentificiran	ni izražanja	povišano
Wi 7	Protein, vključen v celično morfogenezo in proliferacijo, povezan je s kinazo Cbk (to je: kinazo biosinteze celične stene) [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	povišano	znižano
Wi 8	neidentificiran	znižano	povišano
Wi 9	B podenota V1 periferne membranske domene vakuolarne H <sup>+</sup> -ATPase (V-ATPase) [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	znižano	povišano
Wi 10	neidentificiran	znižano	povišano

Preglednica 13: Seznam analiziranih proteinov celične stene *H. werneckii*.

Oznaka proteinske lise	Identificiran protein	Regulacija izražanja proteina	
		15 % NaCl	25 % NaCl
Hw 1	neidentificiran	povišano	znižano
Hw 2	prekurzor keto-acil reduktoizomeraze [ <i>Neurospora crassa</i> ]	povišano	znižano
	verjetna delta(24)-sterol C- metiltransferaza [ <i>Neurospora crassa</i> ]	povišano	znižano
Hw 3	citoplazmatski šaperon iz družine Hsp90	povišano	znižano
Hw 4	spermidin sintaza [ <i>Aspergillus nidulans</i> ]	povišano	znižano
Hw 5	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	povišano	znižano
Hw 6	prekurzor keto-acil reduktoizomeraze [ <i>Neurospora crassa</i> ]	povišano	znižano
Hw 7	33kDa velik protein celične stene	povišano	znižano
Hw 8	HSP70 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	znižano	povišano
Hw 9	hipotetični protein vročinskega šoka 70 kDa [ <i>Neurospora crassa</i> ]	znižano	povišano
Hw 10	Enolaza (2-fosfoglicerat dehidrataza) (glavni alergen Alt a 11)	znižano	povišano
Hw 11	6-fosfoglukonat dehidrogenaza [ <i>Coccidioides immitis</i> ]	povišano	znižano
Hw 12	protein vročinskega šoka Hsp70 [ <i>Aspergillus nidulans</i> ]	povišano	znižano
Hw 13	neidentificiran	povišano	znižano
Hw 14	NADP-odvisna manitol dehidrogenaza [ <i>Cladosporium fulvum</i> ]	ni izražanja	povišano
	encim za razvejanje 1,4-alfa-glukana [ <i>Rhizobium leguminosarum</i> ]	ni izražanja	povišano
Hw 15	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	ni izražanja	povišano
Hw 16	kontrolni protein celičnega cikla 2 (od ciklina odvisna proteinska kinaza) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	ni izražanja	povišano

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Oblika in velikost celic ter skupkov celic gliv rodu *Wallemia*

Celice vrst *W. sebi* in *W. muriae* so zelo podobnih oblik (cilindrične oblike) in dimenzij, za razliko od njiju pa so celice *W. ichthyophaga* drugačne, so namreč rahlo sploščene nepravilne kroglice. Meritve celic pri višji in nižji slanosti so pokazale, da slanost ne vpliva na velikost celic. Opazili smo, da postanejo celice *W. sebi* in *W. muriae* pri višji slanosti (20 % NaCl) bolj nepravilnih oblik, površina se nagrbanči. Česa podobnega pri celicah *W. ichthyophaga* nismo opazili. Vse tri vrste celic in tudi skupki celic so v tekočem gojišču svetlo rjave barve.

V tekočem gojišču celice vseh treh vrst oblikujejo skupke. Ti so pri *W. sebi* in *W. muriae* veliki kroglasti, pri *W. ichthyophaga* pa nepravilni in manjši. Pri vseh treh vrstah smo večkrat opazili skupke večjega premera pri višji slanosti. Tvorba takšnih skupkov bi lahko predstavljal zaščito pred zunanjim stresnim okoljem. Visoka slanost v gojišču zmanjša količine biološko dostopne vode, torej predstavlja sušnost. Če so celice posamič, so z vseh strani obdane z medijem, če pa oblikujejo skupke oziroma nekakšne »sklerocije«, pa je v direktnem kontaktu z zunanjim tekočino le površinska plast skupka. Notranja masa celic ali hif je tako zaščitena in verjetno neobremenjena z osmotskim stresom.

Sklerocij pri glivah predstavlja prilagoditev na neugodne razmere. Skupki celic pri glivah rodu *Wallemia* verjetno niso sklerociji. Pri njih namreč ni mogoče najti melanizirane skorje iz mrtvih celic. V notranjosti teh skupkov ni moč najti zalog hrane, zgolj tesno prepleteno mrežo hif oziroma tesno povezane celice. Predvidevamo, da oblikovanje skupkov le zmanjša stično površino celic, ki so v direktnem kontaktu s hiperslanim medijem, in ne predstavlja trajnejše prilagoditve na neugodne razmere.

Morfologija skupkov celic pri rodu *Wallemia* se ne ujema z morfologijo tipičnih sklerocijev, je pa možno, da tvorbo skupkov inducira oksidativni stres, ki nastane tudi kot

posledica hiperslanega okolja. Ugotovljeno je, da oksidativni stres sproži diferenciacijo filamentoznih gliv v sklerocije (Georgiou, 2006), zato je možno, da se to dogaja tudi pri vrstah rodu *Wallemia*. Potemtakem skupki celic pri rodu *Wallemia* lahko predstavljajo nekakšen primitiven tip sklerocijev.

### **5.1.2 Rastne krivulje gliv rodu *Wallemia***

Skupki so onemogočali določevanje rastne krivulje z merjenjem absorbcije svetlobe, zato smo izbrali metodo izdelave rastne krivulje z določanjem suhe biomase kulture. Ker je vzorčenje določenega volumna kulture težko ponovljivo zaradi rasti v skupkih, smo vsakokrat vzorčili celotno vsebino steklenice. Meritve smo izvedli v dveh vzporednicah.

Glive iz rodu *Wallemia* zaznamuje počasna rast v tekočem gojišču. Predhodno adaptirana kultura *W. sebi* doseže logaritemsko fazo rasti v tekočem gojišču v 6. do 7. dnevju pri 5 % slanosti ter dva dni kasneje pri 20 % slanosti. Podobno je pri *W. muriae*. Tudi za glivo *A. pullulans* so pokazali, da raste počasneje s povečevanjem slanosti v gojišču (Račnik, 2004), kar se ujema z njenim halotolerantnim značajem.

Oblike rastnih krivulj vrst *W. sebi* in *W. muriae* so primerljive. Pri višji slanosti pri obeh vrstah nastane nekoliko manj biomase kot pri nižji slanosti, kar kaže, da 20 % NaCl predstavlja stres. Razlog za zmanjšanje celične biomase je lahko zmanjšana celična prostornina pri višji slanosti, kot je to značilno za nekatere morske kvasovke (Hernández-Saavedra et al, 1995). Med opazovanjem in merjenjem dimenzij celic nismo zaznali razlik v velikosti celic pri višji in nižji slanosti gojenja, zato razlago za razliko v biomasah iščemo v energetiki. Znano je, da je življenje v slanem okolju energetsko drago. Za sintezo kompatibilnih topljencev se lahko porabi celo več energije kot za sintezo celičnih sestavin. Tako se s povečevanjem slanosti okolja zmanjša količina sintetiziranega strukturnega celičnega materiala oziroma suhe biomase celic (Oren, 1999). Vrsta *A. pullulans* pridela manj biomase v slanih gojiščih (Račnik, 2004), v čemer je podobna glivama *W. sebi* in *W. muriae*. V skladu z naraščanjem slanosti gojišča, se vrsti *A. pullulans* viša intenziteta

respiracije, kar je verjetno posledica tvorbe kompatibilnih topljencev in vzdrževanje ionskega ravnoesa (Račnik, 2004) in ne izgradnje celične biomase.

Lag faza pri *W. ichthyophaga* v gojišču s 15 % NaCl traja 4 do 5 dni, nato pa zelo hitro preide v eksponentno fazo rasti. Po približno 12-ih dneh inkubacije se prične stacionarna faza. Rastna krivulja pri 25 % NaCl je podobne oblike. Po 7 dneh se začne biomasa počasi večati in gliva počasi napreduje v eksponentno fazo rasti. V srednji eksponentni fazi je od 16 do 17 dni po inokulaciji, stacionarna faza pa se začne po 20-ih dneh rasti. Končna biomasa, dosežena v stacionarni fazi, je primerljiva pri obeh slanostih. To smo večkrat opazili tudi med njenim kasnejšim gojenjem. Četudi bi za *W. ichthyophaga* držalo pravilo zmanjšanje celične prostornine pri višji slanosti, bi razliko v zmanjšanju biomase lahko izničila z debelejšo celično steno. Za tega edinstvenega predstavnika halofilnih evkariontov so namreč ugotovili, da je pri višji slanosti celična stena debelejša (Kralj Kunčič, 2008). Izgleda, da *W. ichthyophaga* pri višji slanosti potrebuje le nekoliko več časa (ima podaljšano lag fazo rasti), da se prilagodi na razmere, zatem pa enako uspešno raste. *W. ichthyophaga* se od ostalih dveh vrst iz rodu *Wallemia* razlikuje po morfoloških značilnostih celic in skupkov celic ter po obliki rastne krivulje.

### **5.1.3 Vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah gliv rodu *Wallemia***

V vseh treh vrstah gliv iz rodu *Wallemia* smo ugotovili tri vrste kompatibilnih topljencev. Gre za sladkorne alkohole, poliole: glicerol, arabitol in manitol. Naši rezultati so potrdili postavljeno hipotezo, da bodo glive iz rodu *Wallemia* najverjetneje kopile kompatibilne topljence za izravnavo osmotskega tlaka preko celične membrane.

V literaturi zasledimo, da vsebujejo celice halofilov molarne koncentracije kompatibilnih topljencev. Zaradi kompleksnih celičnih skupkov nismo uspeli določili števila celic in prostornine citosola v določeni količini suhe biomase, zato koncentracij kompatibilnih topljencev v celicah gliv rodu *Wallemia* ne poznamo, podajamo le količino le-teh na gram suhe biomase. Vsebnosti kompatibilnih topljencev pri rodu *Wallemia* so nizke, in sicer so v območju med 0 in 1,5 milimolom na gram liofilizirane biomase (slika 19).

Glede na podatke iz literature je najpogosteji med kompatibilnimi topljenci evkariontov glicerol, ki je v energetskem smislu tudi najcenejši, poleg tega pa ima odlične topnostne lastnosti pri visokih koncentracijah (Oren, 1999). Za halotolerantno kvasovko *D. hansenii* so pri 2,7 M koncentraciji NaCl (15,8 % (m/V) NaCl) in 1 % (m/V) glukozi v gojišču izmerili vsebnost znotrajceličnega glicerola v koncentraciji 2,6 M (Gustafsson in Norkrans, 1976). To nedvoumno pokaže veliko vlogo glicerola pri osmoadaptaciji vrste *D. hansenii*. Pri vrsti *H. werneckii* vsebnost glicerola korelira s slanostjo gojišča (Petrovič et al., 2002). Vsebnosti glicerola so najvišje med vsemi merjenimi topljenci. Izmerili so 2,5 mmol glicerola/g suhe teže pri 17 % NaCl (2,91 M), pri 20 % NaCl (3,42 M) 2,8 mmol/g suhe teže, pri 25 % (4,28 M) pa 2,94 mol/mg suhe teže celic (Kogej et al., 2007). Za vrsto *A. pullulans* je Hernández-Saavedra s sodelavci (1995) izmeril 7 mol glicerola/mg suhe teže pri 4,0 M (23,4 % (m/V)) NaCl v rastnem mediju. Ko so bile celice *A. pullulans* izpostavljenе subletalni koncentraciji soli (4,5 % (0,77M) NaCl), se je vsebnost glicerola iz komaj zaznavne količine pri kontroli povisala na 1,89 mg/mg proteinov (Managbanag in Torzilli, 2002).

Glicerol smo našli tudi pri vrstah rodu *Wallemia*. Naši rezultati kažejo, da je količinsko najbolj zastopan osmolit med vsemi merjenimi in ga zato lahko pojmemojemo kot glavni osmolit, le vrsta *W. sebi* pri 5 % NaCl izstopa (glicerola je količinko skoraj enako kot arabitola). Pri vrsti *W. ichthyophaga* vsebnost glicerola naraste pri višji slanosti, kar je v skladu s podatki iz literature. Glicerol pri *W. ichthyophaga* predstavlja 66 % celotne količine topljencev pri nižji slanosti in 78 % pri višji slanosti. Pri vrsti *W. muriae* se vsebnost glicerola pri višji slanosti ne povisha, pri vrsti *W. sebi* pa celo pada. Razlog za to je verjetno oblika in velikost skupkov, ki jih tvorita ti dve vrsti (več o tem v nadaljevanju razprave).

Poleg glicerola so pogosti kompatibilni topljenci pri glivah tudi drugi polioli, kot so eritritol, arabitol in manitol. Kopičenje mešanice kompatibilnih topljencev je pri glivah pogosto. *H. werneckii* zunanj osmotski tlak zaradi visokih koncentracij NaCl izenačuje s kopičenjem še dodatnih poliolov (eritritola, arabitola in manitola) poleg glicerola (Kogej et al., 2007). Tudi vrste gliv iz rodu *Wallemia* vsebujejo mešanico kompatibilnih topljencev,

sestavljeni iz treh vrst poliolov (glicerola, arabitol in manitola). Daleč največ med njimi je glicerola, v manjših količinah sledi arabitol, manitola je le v sledeh.

*W. ichthyophaga* ima med vsem tremi vrstami rodu *Wallemia* najvišjo celokupno vsebnost kompatibilnih topljencev (poliolov). V primerjavi s *H. werneckii* so te vsebnosti skoraj dvakrat nižje. Pri 15 % slanosti (2,57 M NaCl) je celokupna vrednost poliolov 1,4 mmol/g suhe biomase, pri slanosti 25 % (4,28 M NaCl) pa 1,8 mmol/g suhe biomase. Pri *H. werneckii* so pri 17 % NaCl (2,91 M) izmerili 2,7 mmol poliolov/g suhe teže, pri 25 % (4,28 M) pa 3,3 mol/g suhe teže celic (Kogej et al., 2007). Razviden je trend porasta količine osmolitov pri višji slanosti, kar je v skladu s pričakovanji. Porast celotne količine kompatibilnih topljencev pri višji slanosti se zgodi le zaradi povišanja vsebnosti glicerola, vsebnosti ostalih dveh osmolitov (arabitala in manitola) padeta. Arabitol predstavlja približno tretjino celokupne količine topljencev pri nižji in petino pri višji slanosti. Manitola je pod 2 % in predstavlja minimalen delež. Podobno so ugotovili tudi za *H. werneckii*, pri kateri se pri zviševanju slanosti nad optimalno poviša le vsebnost glicerola, vsebnosti ostalih kompatibilnih topljencev ostanejo nizke (Kogej et al., 2007). Povprečna koncentracija manitola se je pri s soljo tretiranih celicah *A. pullulans* sicer podvojila, količina trehaloze pa se v tem primeru ni spremenila (Managbanag in Torzilli, 2002).

*W. sebi* (slika 16) vsebuje pri nižji slanosti (5 % (0,86 M) NaCl) skoraj enaki količini glicerola in arabitol, to je 0,25 mmol na gram suhe snovi. Tretjino manj je manitola. Skupna količina vseh treh osmolitov je pod 0,6 mmol na gram suhe snovi. Pri višji slanosti (20 % (3,42 M) NaCl) je skupna količina vseh treh osmolitov 0,1 mmol na gram suhe snovi, torej kar šestkrat manj kot pri nižji slanosti. Večinski delež predstavlja glicerol, ostala dva topljenca sta le v sledeh.

*W. muriae* (slika 17) ima za 30 % več glicerola kot *W. sebi* pri isti slanosti. Količina glicerola (0,35 mmol/g suhe snovi) je primerljiva pri nižji (5 % NaCl) in višji (20 % NaCl) slanosti. Količini ostalih dveh topljencev ponovno padeta pri višji slanosti gojišča, tako da je celokupna vrednost osmolitov pri višji slanosti za skoraj 40 % manjša kot pri nižji

slanosti: pri 5 % NaCl v gojišču ima seštevek osmolitov vrednost 0,6 mmol/g suhe biomase, pri 20 % NaCl v gojišču pa 0,37 mmol/g suhe biomase.

Padec koncentracije kompatibilnih topljencev pri *W. muriae* in *W. sebi* pri višji slanosti ni v skladu s pričakovanji in ga skušamo v nadaljevanju razprave razložiti z velikostjo skupkov. Skupki hif imajo pri višji slanosti v povprečju 1 mm večji premer. Večji premer krogle ima manjše razmerje med površino in prostornino. To je v primeru visoke slanosti v gojišču ugodno, saj je v tem primeru v direktnem stiku z okolnjim medijem manjši delež prostornine hif glede na celoto. Možno je, da se zaradi zaščitenosti notranjih celic kompatibilni topljenci kopijo le v zunanjih celicah. Meritve pokažejo vsebnost kompatibilnih topljencev na celotno biomaso, kar podceni vsebnost kompatibilnih topljencev v celicah, ki jih tvorijo.

Tudi pri vrsti *W. ichthyophaga* smo pri višji slanosti opazili večje skupke, ki so bili nepravilnih oblik, nesferični in z zajedami v notranjost skupka. Ta oblika skupka očitno ne zaščiti celic v notranjosti tako dobro, da bi vsebnost kompatibilnih topljencev glede na suho biomaso pri višji slanosti padla, kot se to zgodi pri vrstah *W. sebi* in *W. muriae*. Kljub temu je vrsta *W. ichthyophaga* zelo dobro prilagojena na rast pri ekstremno visokih slanostih. Zelo verjetno je, da ji to omogoča tudi debela celična stena, ki se pri visokih slanostih še odebeli in postane bolj strukturirana (Kralj Kunčič, 2008).

Primerjava vsebnosti poliolov vrste *H. werneckii* z vrstama *W. sebi* in *W. muriae* pokaže, da so pri slednjih dveh vsebnosti pri vseh testiranih pogojih nižje. Vrsti *W. sebi* in *W. muriae* imata pri 5 % NaCl 0,6 mmol poliolov/g suhe teže, vrsta *H. werneckii* pa 1,7 mmol/g suhe mase (Kogej et al., 2007). Pri 20 % NaCl je vsebnost poliolov pri *H. werneckii* okrog 3 mmol/ g suhe mase (Kogej et al., 2007), pri *W. sebi* in *W. muriae* pa 0,1 ter 0,4 mmol/g suhe mase.

Vrste rodu *Wallemia* pripadajo, po razdelitvi gliv Blomberga in Adlerja (1992), skupini gliv, ki poleg drugih poliolov proizvajajo tudi manitol, tako kot drugi predstavniki bazidiomicet.

### 5.1.4 Vsebnost kationov v celicah gliv rodu *Wallemia*

Kopičenje kationov v celici je strategija, ki je značilna predvsem za ekstremno halofilne arheje (*Halobacteriales*) in anaerobne halofilne bakterije iz redu *Haloanaerobiales*. Za mnoge bakterije, ki kopičijo organske topljence, je ugotovljeno, da vsebujejo tudi visoke koncentracije  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  (Oren, 1999). Večina halotolerantnih in halofilnih gliv vzdržuje pozitivni turgorski tlak pri visoki slanosti s proizvajanjem in kopičenjem organskih kompatibilnih topljencev. Pri določenih glivah, kot je *D. hansenii*, pa k osmotski prilagoditvi prispevajo tudi znotrajcelični kationi (Larsson et al., 1990; Prista et al., 1997; Kogej et al., 2005).

Za rod *Wallemia* smo z meritvami vsebnosti kationov z metodo atomske absorpcijske spektroskopije pokazali, da vsebuje nizke koncentracije ionov (območje nekaj 10 nmol na mg suhe teže biomase). Primerjava vsebnosti  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  v celicah pri nižji in višji slanosti nakazuje isti trend padca oziroma povišanja, kot je opazen pri vsebnosti organskih osmolitov. Zanimivo pa je, da je vsem trem vrstam skupno to, da imajo vedno večjo vsebnost  $\text{Na}^+$  kot  $\text{K}^+$  ne glede na slanost v gojišču ter da imajo vse tri razmerje med  $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$  nižje pri višji slanosti v gojišču (slika 23). Podobno velja tudi za *D. hansenii*. Številni raziskovalci so pokazali, da ima *D. hansenii* pri pogojih visoke slanosti relativno visoko vsebnost natrija (Larsson et al., 1990; Prista et al., 1997; Kogej et al., 2005). Ob povišanju slanosti se je vsebnost  $\text{Na}^+$  v celicah *D. hansenii* povišala, vsebnost  $\text{K}^+$  pa zmanjšala. Kljub temu je bila znotrajcelična koncentracija  $\text{K}^+$  vedno višja od zunanje. Koncentracija  $\text{Na}^+$  je bila nižja v celici kot pa v mediju (Larsson et al., 1990). Tudi pri vrstah rodu *W. sebi* in *W. muriae* se pri višji slanosti (20 % NaCl) poviša vsebnost  $\text{Na}^+$  (pri vrsti *W. sebi* ta trend ni izrazit, saj se zgodi manjši padec v vsebnosti  $\text{Na}^+$ , ki pa je v mejah napake meritve), vsebnost  $\text{K}^+$  pa se zmanjša (sliki 20 in 21). Vrsta *W. ichthyophaga* je od ostalih dveh drugačna tudi v tem smislu, da vsebnosti obeh kationov pri višji slanosti (25 % NaCl) gojišča narasteta; vsebnost  $\text{K}^+$  le malo, vsebnost  $\text{Na}^+$  pa več (slika 22).

Celokupna koncentracija kationov v celicah *D. hansenii* je bila presenetljivo visoka (0,65 M pri 1,35 M NaCl v rastnem mediju) (Larsson et al., 1990). Znotrajcelične

koncentracije  $\text{Na}^+$  ionov so dosegle vrednosti do 800 mM, kar kaže na neobčutljivost metabolizma na visoke koncentracije soli (Prista et al., 1997). Kogej s sodelavci (2005) je pri *D. hansenii* izmerila očitno višje koncentracije natrijevih ionov v celicah kot pri *H. werneckii* in *A. pullulans*. Primerjava vsebnosti  $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$  v vrstah *Wallemia* spp. z omenjenimi vrstami pokaže, da imajo le-te pri vseh preučevanih slanostih občutno višje vsebnosti  $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$ . Zanimivo je, da imajo vrste rodu *Wallemia* tako nizke vsebnosti kationov. Podobno kot pri kompatibilnih topljencih lahko tudi v tem primeru, rezultate razlagamo z rastjo v skupkih. Pri višji slanosti so skupki celic *W. sebi* in *W. muriae* večji in tesnejši. Takšna morfologija nudi celicam v notranjosti skupka boljšo zaščito pred zunanjim okoljem. Skupki celic *W. ichthyophaga* pri višji slanosti so sicer večji, a nepravilnih oblik in enako tesni kot pri nižji slanosti. Vsebnost kationov v celicah naraste pri višji slanosti.

Razmerje med znotrajcelično vsebnostjo  $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$  pri vseh treh vrstah *Wallemia* spp. pade pri višji slanosti (slika 24). Trend padanja razmerja med znotrajceličnima kationoma z višanjem slanosti v gojišču je opazen pri glivah *H. werneckii*, *A. pullulans* in *D. hansenii* (Kogej et al., 2005). Razmerje med  $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) pri vrsti *W. sebi* je pri 5 % NaCl višje (blizu 0,35), pri 20 % slanosti pa se povisha vsebnost natrija in razmerje med kationoma pade na 0,2. Vrsta *W. muriae* ima pri nižji slanosti vsebnosti obeh ionov razmeroma uravnoveženi, kar kaže visoko razmerje  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (med 0,8 in 0,9). Pri višji slanosti je  $\text{Na}^+$  mnogo več, razmerje  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  pade. Razmerje  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  pri vrsti *W. ichthyophaga* pa iz 0,3 pri 15 % na 0,2 pri 25 % NaCl.

### **5.1.5 Proteomika celične stene *W. ichthyophaga* in *H. werneckii***

S subproteomsко analizo smo pridobili vpogled v to, kaj se na nivoju celične stene dogaja pri nižji (10 % NaCl za *H. werneckii* in 15 % NaCl za *W. ichthyophaga*) in višji (25 % NaCl za obe vrsti) slanosti rastnega medija dveh gliv, askomicetne črne kvasovke *H. werneckii* in bazidiomicetne glive *W. ichthyophaga*. Subproteomska mapa proteinov citosola se po preliminarnih raziskavah ni pokazala kot uporaben pogled na dogajanje pri rasti v ekstremno slanih pogojih. Analiza proteinov citosola bi zahtevala številne

optimizacije na nivojih izolacije in ločbe proteinov. Proteinske lise so bile zelo nejasne in svetle, zato smo se v nadaljevanju posvetili proteinom celične stene.

Zanimivo je, da se je pri *H. werneckii* in pri *W. ichthyophaga* izkazalo, da pri višji slanosti gojišča izoliramo manj proteinov na enako maso celic. To je bilo še posebej očitno pri *H. werneckii*, pri kateri smo pri obeh slanostih izolirali mnogo več proteinov kot pri *W. ichthyophaga*. Kaže, da je celična stena pri višji slanosti spremenjena, tako da je učinkovita izolacija proteinov otežkočena. Razlog za to je lahko debelejša stena pri višji slanosti, kar je za *W. ichthyophaga* že ugotovljeno (Kralj Kunčič, 2008).

Presenetila nas je razporeditev proteinov glede na njihovo izoelektrično točko. Pri višji slanosti smo zaradi izpostavljenosti slanosti okolja pričakovali bolj kisle proteine, vendar so bili le-ti razporejeni po širšem območju pH. Pri višji slanosti se je izrazilo celo več bazičnih proteinov kot pri nižji slanosti. Tudi pri *Boletus edulis* 4 % NaCl glede na 0 % NaCl ni povzročil sprememb v izoelektričnih točkah proteinov (Liang et al., 2007). Ta pojav Yin s sodelavci (2008) razлага z N- in O- vezanimi ogljikovodikovimi verigami glikoproteinov. Stranske verige glikoproteinov namreč nosijo spremenljivo število negativnih nabojev zaradi fosfodiesterskih mostičkov ali uronske kisline, kar ima za posledico nastanek številnih glikoform z različno izoelektrično točko. Poleg tega pa so lahko te verige različno dolge in so različno dolgo prisotne na nekem glikozilacijskem mestu. Nastanejo številne glikoforme z različno maso. Slika dvodimenzionalne gelske elektroforeze ima zato multiple in nejasne lise ene vrste glikoproteina, kar smo opazili tudi sami. Pri *W. ichthyophaga* smo iz dveh ločenih lis identificirali en izoencim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze, pri *H. werneckii* pa prekurzor keto-acil reduktoizomeraze.

Ugotovili smo, da so med izoliranimi proteini številni citosolni. Razlog za to je v načinu izolacije proteinov. Celice smo homogenizirali in tako sprostili njihovo vsebino. Med proteine celične stene so tako zašli tudi proteni citosola. Da bi dobili zgolj proteine celične stene v vzorcu, bi morali izboljšati način izolacije.

Pri *W. ichthyophaga* smo uspeli identificirati 7 od 10 diferenčno izraženih proteinov celične stene. Večina izmed njih se v večji meri izrazi pri povišani slanosti (25 % NaCl v

gojišču), le eden se je pri višji slanosti izražal manj. To sovpada z rezultati proteomske analize *D. hansenii*, pri kateri se ob prisotnosti soli izrazi 28 % proteinov več kot pri pogojih brez soli (Gori et al., 2007).

Izmed proteinov, ki se pri *W. ichthyophaga* v večji meri izražajo pri visoki slanosti (25 % NaCl), najbolj izstopata izoencima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GPD), ki sodeluje v biosintezi glicerola iz glukoze. Encim GPD s pomočjo NAD<sup>+</sup> pretvori gliceraldehid-3-fosfat v glicerat-1,3-difosfat, ki se v nadalnjih korakih pretvori v glicerol, ali pa kot piruvat vstopi v Krebsov cikel (Kim et al., 2006). GPD je pri *A. nidulans* udeležen tudi v različnih stresnih odzivih, v apoptozo in oksidativni stresni odziv (Dastoor in Dreyer, 2001). Tudi pri analizi proteoma *Boletus edulis* (Liang et al., 2007) se omenjeni encim povišano izraža pri slanostnem stresu. Avtor to razloži s povišano glikolizo pri višji slanosti in s tem povezanim večjim dotokom energije. Poleg tega pa je glikoliza ključna tudi v osmoregulaciji, in sicer za biosintezo glicerola. Kot smo pokazali že z določitvijo vsebnosti organskih osmolitov, imajo celice pri višji slanosti večjo vsebnost glicerola. Identificiran protein torej sovpada s tem rezultatom. Tudi pri *D. hansenii* so ugotovili, da so s soljo inducirani proteini vključeni v zgodnje poti glikolize (Gori et al., 2007). Povišanje sinteze glicerola vrste *H. werneckii* pri višji slanosti podpira tudi identifikacija dveh genov, *HwGPD1* in *HwGPD2*. Le slednji gen je bil izražen diferenčno pri povišani slanosti. Izgleda, da je biosinteza glicerola regulirana na nivoju transkripcije *GPD* (Petrovič et al., 2002). Podobno so Albertyn in sodelavci (1994) ugotovili za *S. cerevisiae*. Tudi pri tej vrsti je glicerol glavni kompatibilni topljenec, mutante v *GPD1* pa so tvorile izjemno malo glicerola in so bile občutljive na osmotski stres. Izražanje ključnega encima za biosintezo glicerola regulira signalna pot HOG (»high-osmolarity glycerol«).

Zanimiv protein, ki smo ga identificirali v proteomski mapi *W. ichthyophaga*, je glikozil transferaza iz *Symbiobacterium thermophilum*. To je nekultivabilna termofilna bakterija, katere rast je odvisna od mikrobnega komenzalizma in sama zase ne raste pri standardnih pogojih gojenja (Ueda et al., 2004). Prisotnost identificiranega proteina bi lahko kazala na možnost endosimbiontskega odnosa med *W. ichthyophaga* in omenjeno bakterijo, kar bi bilo v prihodnje vsekakor zanimivo preveriti in dokazati. Lahko, da gre v tem slučaju le za okužbo vzorca (to možnost bi izločili z večkratno ponovitvijo in identifikacijo proteina).

Glikozil transferaza je encim, ki kataliza prenos enega ali večih aktiviranih sladkorjev na akceptorsko molekulo, pri čemer nastane glikoziliran produkt. Če je akceptorska molekula aktiviranega sladkorja proteinski ostanek, lahko nastanejo bodisi O-vezani bodisi N-vezani glikoproteini (Breton et al., 2006). Glede na to, da glikoproteini celične stene pri glivah sodelujejo pri ohranjanju celične integritete in pri spopadanju z oksidativnim stresom (Yin et al., 2008), ima povišano izražanje encima glikozil transferaza in posledična glikozilacija potencialno vlogo pri zaščiti glive pred slanim okoljem.

Protein, ki se pri slanosti 25% v celični steni *W. ichthyophaga* izraža v manjši meri, je vključen v morfogenezo in proliferacijo celic. Povezan je s Cbk kinazo, to je s kinazo, udeleženo v biosintezi celične stene. Zmanjšano izražanje proteina pri visoki slanosti potrja dejstvo, da celica vlaga več energije v spopadanje s slanim okoljem (sinteza kompatibilnih topljencev, vzdrževanje ionskega ravnovesja) kot pa v tvorbo biomase (Oren, 1999).

Pri *H. werneckii* smo identificirali 14 od 16 diferenčno izraženih proteinov celične stene. 10 proteinov se v večji meri izraža pri nižji slanosti (10% NaCl v gojišču), 6 pa pri višji slanosti (25% NaCl). Izmed proteinov, ki se v večji meri izražajo pri visoki slanosti ponovno najbolj izstopa encim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GPD), kar kaže na povišano glikolizo in njeno vlogo v osmoregulaciji pri glivah. Pri obeh slanostih se izražajo proteini vročinskega šoka, pri 15 % NaCl dva ter pri 25 % NaCl eden. Ti proteini se izražajo pod vplivom različnih okoljskih stresov in naj bi sodelovali tudi pri toleranci na sol (Liang et al., 2007). Tudi pri raziskavi proteomskeih sprememb med izpostavitvijo soli glive *D. hansenii* so našli en iduciran ter dva represirana proteina vročinskega šoka (Gori et al., 2007). S tega stališča je zanimivo, da smo proteine vročinskega šoka našli le pri *H. werneckii*, ki ji slanost prinaša določen stres. Pri *W. ichthyophaga* teh proteinov nismo našli, kar namiguje ali na to, da slanost v primeru te izjemne vrste ne predstavlja stres, temveč povsem običajno karakteristiko njenega okolja, ali pa na drugačno odzivanje na slanost dveh filogenetsko odaljenih vrst (askomicetna in bazidiomicetna gliva).

## 5.2 SKLEPI

1. Glive iz rodu *Wallemia* zaznamuje počasna rast v skupkih v slanem tekočem gojišču. *W. ichthyophaga* se od ostalih dveh vrst iz rodu *Wallemia* razlikuje po morfoloških značilnostih celic in skupkov celic in po obliki rastne krivulje.
2. Skupki vrst *W. sebi* in *W. muriae* so kroglasti in so pri višji slanosti v povprečju večji kot pri nižji. Večja biomasa tesno prepletenih hif predstavlja neke vrste zaščito pred stresom. Skupki vrste *W. ichthyophaga* so manjši in nepravilnih oblik.
3. Glive vrste *W. ichthyophaga* dosežejo v slanem gojišču višjo biomaso kot glive vrste *W. sebi* in *W. muriae*.
4. Glive iz rodu *Wallemia* kopičijo tri vrste kompatibilnih topljencev: glicerol, arabitol in manitol. Količinsko je pri vseh treh vrstah daleč največ glicerola, sledi arabitol, najmanj pa je manitola. Vsebnosti organskih osmolitov so v območju do nekaj mmol/g suhe teže.
5. Glige iz rodu *Wallemia* vzdržujejo nizke znotrajcelične koncentracije kationov ( $K^+$  in  $Na^+$ ), ki so v območju nekaj 10 nmol na mg suhe teže celic. Vsebnosti  $Na^+$  so višje od vsebnosti  $K^+$  tako pri nižji kot pri višji slanosti v gojišču. To, skupaj s zahtevno soli v rastnem mediju, potrjuje hipotezo, da je *W. ichthyophaga* prvi pravi halofilni evkariont.
6. Nizke vsebnosti tako organskih kot tudi anorganskih osmolitov so verjetno posledica rasti v obliki gostih skupkov celic, znotraj katerih so celice manj izpostavljene slanem okolju oziroma so verjetno zaščitene pred slanostnim stresom. Gre za neke vrste morfološko prilagoditev na rast pri slanih pogojih.
7. Subproteomska analiza proteinov celične stene *W. ichthyophaga* je pokazala, da pri višji slanosti proteini ne postanejo bolj kisli, temveč so proteini razporejeni po širšem območju pH. Pokazalo se je tudi diferenčno izražanje nekaterih proteinov, vključenih v metabolizem sladkorjev in celično morfogenezo pri 25 % NaCl.

## 6 POVZETEK

*Wallemia* je rod kozmopolitskih kserofilnih gliv, ki rastejo v različnih okoljih z nizko vodno aktivnostjo (sladka, slana in posušena hrana, zrak, zemlja, soline in slana jezera). Glede na edinstveno morfologijo, evolucijo in kserotoleranco je bil opisan nov bazidiomicetni razred Wallemiomycetes z redom Wallemiales. V njegovem okviru so opredelili le rod *Wallemia* s tremi vrstami (*W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*), od katerih sta slednji dve novi za znanost. Vrste se med seboj razlikujejo po ITS regijah ribosomalne DNK, po velikosti konidijev in kserotoleranci. Vrsti *W. sebi* in *W. muriae* sta si v primerjavi s *W. ichthyophaga* glede teh karakteristik bolj sorodni in podobni. Vse tri vrste so kserofilne in halofilne, *W. ichthyophaga* pa je v tem trenutku najbolj halofilni evkariontski organizem opisan doslej, saj za rast potrebuje minimalno 9 % NaCl v gojišču. Pravi optimum slanosti v gojišču še ni določen. Rod *Wallemia* je zanimiv tudi s filogenetskega stališča, saj predstavlja staro, ločeno linijo znotraj debla *Basidiomycota*, med katerimi tako rekoč ni opisanih kserofilnih gliv in je komajda nekaj kserotolerantnih (Zalar et al., 2005).

Halofilni organizmi imajo dve osnovni strategiji prilagoditve na visoko slanost v zunanjem okolju. Pri prvi strategiji vnašajo ione v celico do nivoja izenačitve turgorja in ozmotskega tlaka, pri drugi strategiji pa ozmotski tlak v celici izravnava s sintezo kompatibilnih topljencev (Oren, 1999). Poleg tega pa razvijejo tudi posebne prilagoditve na nivoju celične membrane in celične stene. Vrste rodu *Wallemia* so bile opisane šele pred nedavnim, zato o njihovih mehanizmih prilagajanja na visoko slanost ni bilo znanega še ničesar.

Vse tri vrste smo gojili v tekočem gojišču pri dveh skrajnih slanostih; pri nižji (5 % NaCl (m/V) za vrsti *W. sebi* in *W. muriae* ter 15 % NaCl za vrsto *W. ichthyophaga*) in ekstremno visoki slanosti (20 % NaCl za vrsti *W. sebi* in *W. muriae* ter 25 % NaCl za vrsto *W. ichthyophaga*). Z določanjem suhe biomase kulture smo izdelali dve rastni krivulji za posamezno vrsto. Obliko in velikost celic ter skupkov celic smo opazovali s svetlobnim mikroskopom. Količino in tip kompatibilnih topljencev smo določili s HPLC, vsebnost K<sup>+</sup>

in  $\text{Na}^+$  pa z AAS. Za najbolj ekstremno vrsto, *W. ichthyophaga*, smo analizirali tudi diferenčno izražanje subproteoma celične stene, tako da smo izvedli 2DEF proteinov celične stene pri 15 % in 25 % NaCl. Proteine smo identificirali z metodo tandemske masne spektroskopije.

Ugotovili smo, da sta si vrsti *W. sebi* in *W. muriae* fiziološko in morfološko bolj podobni v primerjavi z *W. ichthyophaga*. Podobno velike celice vrst *W. sebi* in *W. muriae* so cilindrične oblike, za razliko od njiju pa so celice *W. ichthyophaga* diametrične oblike. V tekočem gojišču celice vseh treh vrst oblikujejo skupke. Ti so pri *W. sebi* in *W. muriae* veliki in kroglasti, pri *W. ichthyophaga* pa manjši in sploščeni. Tvorba skupkov bi lahko predstavljala zaščito pred zunanjim stresnim okoljem. Visoka slanost v gojišču zmanjša količine biološko dostopne vode, torej predstavlja sušnost. Če so celice posamič, so z vseh strani obdane z medijem, če pa oblikujejo skupke oziroma nekakšne primitivne »sklerocije«, pa je v direktnem kontaktu z zunanjim tekočino le površinska plast skupka. Notranja masa celic ali hif je tako zaščitena in verjetno neobremenjena z osmotskim stresom.

Glive iz rodu *Wallemia* kopičijo tri vrste kompatibilnih topljencev: glicerol, arabitol in manitol. Količinsko je pri vseh treh vrstah daleč največ glicerola, sledi arabitol, najmanj pa je manitola. Vsebnosti organskih osmolitov so v območju do nekaj mmol/g suhe teže in zato niso dovolj visoke, da bi v celoti razložile strategijo osmoadaptacije z organskimi osmoliti. Vse tri vrste vzdržujejo nizko vsebnost kationov ( $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$ ), ki so v območju nekaj 10 nmol na mg suhe teže celic. Vsebnosti  $\text{Na}^+$  so višje od vsebnosti  $\text{K}^+$  tako pri nižji kot pri višji slanosti v gojišču, kar je vsekakor nenavadno, saj je  $\text{Na}^+$  za celice *S. cerevisiae* toksičen. Vrsta *W. ichthyophaga* je edina izmed doslej opisanih gliv, ki ne raste v okolju z manj kot 9 % (m/v) NaCl, kar kaže, da gre za prvi pravi halofilni evkariontski organizem. Vrednosti razmerja med  $\text{K}^+$  in  $\text{Na}^+$  to idejo podpirajo.

Subproteomske analize proteinov celične stene *W. ichthyophaga* so pokazale diferenčno izražanje nekaterih proteinov, vključenih v metabolizem sladkorjev in celično morfogenezo pri 15 % in 25 % NaCl. Izmed proteinov, ki se v večji meri izražajo pri visoki slanosti, najbolj izstopata izoencima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GPD), ki

sodelujeta v biosintezi glicerola iz glukoze. Protein, ki se pri slanosti 25 % NaCl v celični steni *W. ichthyophaga* izraža v manjši meri, je protein, vključen v morfogenezo in proliferacijo celic, saj je sodeležen v biosintezi celične stene.

Za popolno razložitev strategije prilagoditve gliv iz rodu *Wallemia* na rast pri slanih pogojih bi bilo potrebno preizkusiti fiziološki odziv pri večih slanostih ter preveriti dogajanje med slanostnim šokom. Meritve bi pokazale, katere izmed snovi imajo vlogo primarnega kompatibilnega topljenca. Naši rezultati potrujejo hipotezo, da je za ohranjanje celične integritete pri slanih pogojih pomembno kopiranje znotrajceličnih osmolitov ter druge prilagoditve na nivoju oblike celic in celičnih skupkov ter na nivoju celične stene.

## 7 VIRI

- Adler L., Blomberg A., Nilsson A. 1985. Glycerol Metabolism and Osmoregulation in the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology* 162(1): 300-306
- Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J.M., Prior B.A. 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 14(6): 4135-4144
- Allred A., Baxter B. K., Microbial Life in Hypersaline Environments, Educational Resources, Microbial Life (zadnja sprememba, 27. Avg. 2007)  
<http://serc.carleton.edu/microbelife/extreme/environments.html> (2. avg. 2008)
- Almagro A., Prista C., Benito B., Loureiro-Dias M. C., Ramos J. 2001. Cloning and Expression of Two Genes Coding for Sodium Pump in Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology* 183(10): 3251-3255
- Analytical Chemistry and Instrumentation, Atomic-Absorption Spectroscopy (AA). 1996-97.  
<http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/spec/atomic/aa.htm> (27. jan. 2009)
- Analytical Chemistry and Instrumentation, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). 1996-97. <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm>
- Andreishcheva E.N., Isakova E.P., Sidorov N.N., Abramova N.B., Ushakova N.A., Shaposhnikov G.L., Soares M. I. M., Zvyagilskaya. 1999. Adaptation to Salt Stress in Salt-Tolerant Strain of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow)*, 64 (9): 1061-1067
- Arakawa T., Timasheff S. N. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47(3): 411-414
- Blomberg A., Adler L. 1992. Physiology of Osmotolerance in Fungi. *Advances in Microbial Physiology* 33: 145-212
- Breton C., Šnajdrová L., Jeanneau C., Koca J., Imbert A. 2006. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16(2): 29R-37R
- Butinar L., Sonjak S. , Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina* 48: 73-79

- Cabib E., Dong-Hyun R., Schmidt M., Crotti L. B., Varma, A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 276(23): 19679–19682
- Dastoor Z., Dreyer J.L., 2001. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *Journal of Cell Science* 114(9): 1643–1653
- de Hoog G.S., Zalar P., Urzi C., de Leo F., Yurlova N.A., Sterflinger K. 1999. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology* 43: 33-40
- Duran A., Nombela C. 2004. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology* 150: 3099-3103
- Galinski E. A. 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487-496
- Galinski E. A. 1995. Osmoadaptation in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 37: 273-328
- Galinski E. A., Truper H. G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 95-108
- Georgiou C. D., Patsoukis N., Papapostolou I., Zervoudakis G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46(6): 691-712
- Gori K., Hébraud M., Chambon C., Mortensen H. D., Arneborg N., Jespersen L. 2007. Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Research*, 7(2): 293 – 303
- Graves P. R., Haystead T. A. J. 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(1): 39-63
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2006. Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 5: 323-331
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns- natural ecological niches for halophilic black yeast. *FEMS Microbiology Ecology* 32(3): 235-240

- Gustaffson L., Norkrans B. 1976. On the Mechanism of Salt Tolerance. Production of Glycerol and Heat during Growth of *Debaryomyces hansenii*. Archives of Microbiology 110(2-3): 177-183
- Hernandez-Saavedra N.Y., Ochoa J.L., Vazques-Dulholt R. 1995. Osmotic adjustment in marine yeast. Journal of Plankton Research 17(1): 59-69
- Hohmann S. 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66(2): 300-372
- Kim Y., Nandakumar M. P., Marten M. R. 2006. Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. Fungal Genetics and Biology 44(9): 886-895
- Kim Y., Nandakumar M. P., Marten M. R. 2007. Proteomics of filamentous fungi. TRENDS in Biotechnology 25(9): 395- 400
- Kim Y., Nandakumar M. P., Marten M. R. 2008. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. Briefing in Functional Genomics and Proteomics 7(2) 87-94
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 26(3), 239–256.
- Kogej T., Gorbushina A. A., Gunde-Cimerman N. 2006. Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanizations and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. Mycological Research 110(6): 713-724
- Kogej T., Gostinčar C., Volkmann M., Gorbushina A. A., Gunde-Cimerman N. 2006. Mycosporines in Extremophilic Fungi – Novel Complementary Osmolytes? Environmental Chemistry 3(2): 105-110
- Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. The Halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pollulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments. Applied and Environmental Microbiology 71(11): 6600-6605
- Kogej T., Stein M., Volkmann, Gorbushina A.A., Galinski E.A., Gunde-Cimerman N. 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. Microbiology 153: 4261-4273
- Kralj Kunčič M., Drobne, D., Gunde-Cimerman, N. Prilagoditve gliv iz rodu *Wallemia* spp. na rast v ekstremno slanem in ekstremno sladkem okolju. V: GUNDE-CIMERMAN, Nina (ur.), DROBNE, Damjana (ur.). *Biodan 08: Ljubljana, 11. februar 2008*

- Kurz M. 2008. Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Systems* 4:6
- Larsson C., Morales C., Gustafsson L., Adler L. 1990. Osmoregulation of the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii* Grown in a Chemostat at Different Salinities. *Journal of Bacteriology* 172(4): 1769-1774
- Liang Y., Chen H., Tang M., Shen S. 2007. Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock. *Mycological Research* 111(8): 939-946
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. 10th Edition. New Jersey: 448-451
- Managbanag J. R., Torzilli A. P. 2002. An analysis of trehalose, glycerol and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 94(3): 384-391
- Matheny P.B., Gossman J.A., Zalar P., Kumar T.K.A., Hibbett D.S. 2006. Resolving the phylogenetic position of the Wallemiomycetes: an enigmatic major lineage of Basidiomycota. *Canadian Journal of Botany* 84(12): 1794-1805
- Mattos C. 2002. Protein-water interactions in a dynamic world. *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(4): 203-208
- Oren A. 1999. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(2): 334-348
- Petrovič U., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 1999. Salt stress affects sterol biosynthesis in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Microbiology Letters* 180(2): 325-330
- Petrovič U., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular Microbiology* 45(3): 665-672
- Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* to high environmental salinity. V: Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Gunde-Cimerman N. (ed.), Oren A. (ed.), Plemenitaš A. (ed.). Dordrecht, Nizozemska: 455-470
- Prista C., Almagro A., Loureiro-Dias M. C., Ramos J. 1997. Physiological Basis for the High Salt Tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (10): 4005-4009

- Račnik T. 2004. Primerjava metabolizma halofilne glive *Hortaea werneckii* in halotolerantne *Aureobasidium pullulans* pri različnih slanostih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Roberts M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Systems 1:5
- Selitrennikoff C. P. 2001. Antifungal Proteins. Applied And Environmental Microbiology 67(7): 2883–2894
- Slaninová I., Šesták S., Svoboda A., Farkaš V. 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology 173(4): 245–252
- Smits G. J., van den Ende H., Klis F. M. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbiology 147: 781–794
- Sterflinger K., de Hoog K. S., Haase G. 1999. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. Studies in Mycology 43: 5-22
- Turk M., Mejanelle L., Šentjurc M., Grimalt J.O., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. Extremophiles 8(1): 53–61
- Turk M., Montiel V., Žigon D., Plemenitaš A., Ramos J. 2007. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. Microbiology 153: 3586-3592
- Vaupotič T., Veranič P., Jenoe P., Plemenitaš A. 2008. Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. Fungal Genetics and Biology, Volume 45(6): 994-1007
- Wood G.M., Mann P.J., Lewis D.F., Reid W.J., Moss M.O. 1990. Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. Food additives and Contaminants. 7 (1): 69-77
- Wu Z., Tsumura Y., Blomquist G., Wang X.-R. 2003. 18S rRNA Gene Variation among Common Airborne Fungi, and Development of Specific Oligonucleotide Probes for the Detection of Fungal Isolates. Applied and Environmental Microbiology 69(9): 5389–5397
- Yancey P. H. 2001. Water Stress, Osmolytes and Proteins. American Zoologist, 41(4): 699-709

- Yin Q. Y., de Groot P. W. J., de Koster C. G., Klis F. M., 2008. Mass spectrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins. *Trends in Microbiology* 16 (1): 20-26
- Yin Q. Y., de Groot P. W. J., Dekker H. L., de Jong L., Klis F. M., de Koster C. G. 2005. Comprehensive Proteomic Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *The Journal of Biological Chemistry* 280(21): 20894-20901
- Zalar P. 1999. Halofilne črne kvasovke v vodah solih. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Zalar P., de Hood G. S., Schroers H.-J., Frank J. M., Gunde-Cimerman N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Anthonie van Leeuwenhoek* 87(4): 311-328
- Zalar P., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology of halotolerant dothidaceus black yeasts. *Studies in Mycology* 43: 38-48
- Zalar P., de Hoog G.S., Gunde-Cimerman N. 1999a. *Trimmatostruma salinum*, a new species from hypersaline waters. *Studies in Mycology* 43: 57-62
- Zeng Q. Y., Westerman S. O., Rasmussen-Lestander Å., Wang X. R. 2004. Detection and Quantification of *Wallemia sebi* in Aerosols by Real-Time PCR, Conventional PCR, and Cultivation. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12): 7295–7302

## ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za vse dane priložnosti in navdušenje nad znanstvenim delom. Hvala somentorici dr. Tini Kogej za usmerjanje dela, vsa razmišljanja o tematiki ter za poglobljen pregled diplomskega dela. Hvala recezentki prof. dr. Ani Plemenitaš in dr. Tomažu Vaupotiču za izkušnje v biokemijskem laboratoriju. Hvala vsem ostalim strokovnjakom in sodelavcem, ki so mi z neprecenljivim znanjem pomagali orati ledino. Najlepša hvala staršem za popolno podporo in bratu za vse računalniške inštrukcije ter hvala vsem prijateljem, da to so.

»Like a plant that starts up in showers and sunshine and does not know which has best helped it to grow, it is difficult to say whether the hard things or the pleasant things did me the most good.«

L. Larcom