

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mila KRSTIĆ

**VPLIV KROMOVIH IN ŽELEZOVIH IONOV NA PROTEOM
KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* V KONTINUIRNEM
BIOPROCESU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mila KRSTIĆ

**VPLIV KROMOVIH IN ŽELEZOVIH IONOV NA PROTEOM
KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* V KONTINUIRNEM
BIOPROCESU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

INFLUENCE OF CROMIUM AND IRON IONS ON THE PROTEOM OF YEAST
Saccharomyces cerevisiae IN CONTINUOUS BIOPROCESS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

*Diplomsko delo posvečam svojim dvema
Aleksandroma, očetu in sinu.*

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskava je bila opravljena v laboratoriju na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorico doc.dr. Polono Jamnik ter za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentorica: doc.dr. Polona Jamnik

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: Prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: Doc. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: Doc. dr. Blaž Cigić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mila Krstić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.23/.24:582.282.23:546.76:577.112.4(043)=163.6
KG kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/biomasa/železo/krom/stres/oksidativni stres/toksičnost kovin/antioksidativni obrambni sistem/ proteinski profil/proteom kvasovke
AV KRSTIĆ, Mila
SA RASPOR, Peter (mentor)/JAMNIK, Polona (somentorica)/CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN VPLIV KROMOVIH IN ŽELEZOVIH IONOV NA PROTEOM KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* V KONTINUIRNEM BIOPROCESU
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 51 str., 15 pregl., 12 sl., 1 pril., 57 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V nalogi smo hoteli ugotoviti, če povišana koncentracija kromovih in/ali železovih zvrsti povzroči spremembo v fiziologiji in tudi izražanju proteinskega profila. Eksperimentalno delo je potekalo v dveh delih. V prvem delu smo celice kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) izpostavili Cr(III) ionom v kontinuirnem sistemu. V drugem delu poskusa smo postopek ponovili in celice izpostavili najprej vplivu Fe(III) ionov, potem še Cr(III) ionom. Obakrat smo vpliv spremljali po 24 urni kultivaciji, in sicer na celotni ravni z merjenjem živosti in znotrajcelične oksidacije ter na ravni proteoma s proučevanjem proteinskega profila celičnega ekstrakta. Znotrajcelično oksidacijo smo določali z dodatkom fluorescenčnega indikatorja dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata (H₂DCFDA). Živost celic smo določali s pomočjo komercialnega kompleta, ki vsebuje dve barvili SYTO[®] 9 in propidijev jodid. Analizo proteinov celičnega ekstrakta smo izvedli z 2-D elektroforezo in nato proteinske profile obdelali s pomočjo računalniškega programa 2-D Dymension. Rezultati na ravni proteoma so pokazali razliko v vplivu Cr(III) in Fe(III) ionov na celico, medtem, ko z merjenjem živosti in znotrajcelične oksidacije te razlike nismo potrdili. Izpostavitev celic najprej Fe(III) ionom in naknadno še Cr(III) ionom povzroči znatno inhibicijo živosti v primerjavi s posameznimi ioni ter še dodatno spremembo v vsebnosti reaktivnih kisikovih (ROS) zvrsti in proteinskem profilu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.23/.24:582.282.23:546.76:577.112.4(043)=163.6
- CX yeasts/ *Saccharomyces cerevisiae*/ biomass/iron/chromium/stress/oxidative stress/toxicity of minerals/antioxidative defence system/protein profile/proteom of yeast
- AU KRSTIĆ, Mila
- AA RASPOR, Peter (supervisor)JAMNIK, Polona (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)
- PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2009
- TI INFLUENCE OF CHROMIUM AND IRON IONS ON THE PROTEOM OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* IN CONTINUOUS BIOPROCESS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 51p., 15 tab., 12 fig., 1 ann., 57 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the work we wanted to find out whether increased concentration of Cr and/or Fe species causes change in physiology and also in protein expression. Experimental work was carried out in two parts. In the first part of experiment cells of *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) were exposed to Cr(III) ions in continuous system. In the second part of the experiment the procedure was repeated but the cells were exposed to Fe(III) ions and afterwards to Cr(III) ions. In both cases the influence was detected after 24 hours at the cellular level by measuring cell viability and intracellular oxidation as well as at proteome level by analyzing protein profile of cell extract. The intracellular oxidation was determined by addition of fluorescent indicator dihydro-2,7-diacetate dichlorofluorescein (H₂DCFDA). By adding a commercial kit with SYTO[®] 9 and propidium iodide dyes we assessed the cell viability. Analysis of proteins of cell extract was carried out by 2-D electrophoresis and then protein profiles were evaluated by software 2-D Dymension. The results obtaining at proteome level showed the difference between influence of Cr(III) and Fe(III) ions on cells while thus difference was not proved by measuring cell viability and intracellular oxidation. The exposure of cells to Fe(III) ions first and afterwards additionally to Cr(III) ions caused considerable inhibition in cell viability in comparison to individual ions as well as additionally changes in reactive oxygen species (ROS) content and protein profile.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OKSIDATIVNI STRES	3
2.1.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	3
2.1.1.1 Superoksidni anion	4
2.1.1.2 Vodikov peroksid	5
2.1.1.3 Hidroksilni radikal	5
2.1.2 Encimska zaščita celice pred ROS	6
2.1.2.1 Superoksid-dismutaza	6
2.1.2.2 Katalaza	7
2.1.2.3 Glutation-peroksidaza	7
2.1.3 Neencimska zaščita celice pred ROS	8
2.2 KOVINSKI IONI IN OKSIDATIVNI STRES	8
2.3 METODE ZA SPREMLJANJE OKSIDATIVNEGA STRESNEGA ODGOVORA CELICE KVASOVK	9
2.4 ANALIZA PROTEOMA	10
2.5 DELOVNA HIPOTEZA	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 POTEK DELA	12
3.2 MATERIAL	13
3.2.1 Mikroorganizem	13
3.2.2 Gojišča	13
3.2.3 Reagenti in raztopine	14
3.2.3.2 Določanje živosti	14
3.2.3.3 Določanje znotrajcelične oksidacije	15

3.2.3.4	Priprava celičnega ekstrakta kvasovk.....	15
3.2.3.5	2-D elektroforeza.....	16
3.2.3.6	Detekcija proteinov na 2-D gelu.....	18
3.2.4	Oprema in aparature	19
3.2.5	Steklovina in potrošni material	20
3.2.6	Programska oprema:.....	20
3.3	METODE	21
3.3.1	Kontinuirni bioproces	21
3.3.2	Merjenje prirasta biomase s spremljanjem optične gostote brozge	22
3.3.3	Ocena znotrajcelične oksidacije	22
3.3.4	Določanje živosti celic.....	23
3.3.5	Priprava celičnega ekstrakta za analizo proteinov.....	24
3.3.5.1	Razbijanje celic:	24
3.3.5.2	Merjenje koncentracije proteinov	24
3.3.5.3	Čiščenje proteinov v celokupnem proteinskem ekstraktu s kompletom “2-D Clean Up kit” (GE Healthcare).....	25
3.3.6	2-D elektroforeza	26
3.3.7	Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu	29
3.3.7.1	Barvanje 2-D gelov z barvilom SYPRO RUBY	29
3.3.7.2	Slikanje gelov in računalniška obdelava slike.....	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	VPLIV Cr(III) IN Fe(III) NA ŽIVOST IN ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO	31
4.2	VPLIV Cr(III) IN Fe(III) NA IZRAŽANJE PROTEINOV	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.2	SKLEPI.....	43
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI	45

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava gojišča YNB brez aminokislin (Yeast, 2000).....	13
Preglednica 2: Priprava gojišča YNB za submerzno kultivacijo.....	13
Preglednica 3: Pufer za ekstrakcijo proteinov.....	15
Preglednica 4: Raztopina za rehidracijo trakov.....	16
Preglednica 5: Osnovni pufer za uravnoteženje trakov.....	17
Preglednica 6: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm.....	17
Preglednica 7: 1 X SDS elektroforezni pufer.....	18
Preglednica 8: Potek barvanja 2-D gelov z barvilom SYPRO RUBY.....	29
Preglednica 9: Določanje znotrajcelične oksidacije okidacije po dodatku Cr(III) ionov pri kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	31
Preglednica 10: Določanje živosti po dodatku Cr(III) ionov pri kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	32
Preglednica 11: Določanje znotrajcelične oksidacije po dodatku Fe(III) ionov in kombinacije Fe(III)/Cr(III) pri kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	32
Preglednica 12: Določanje živosti po dodatku Fe(III) ionov in kombinaciji Fe(III)/Cr(III).pri kvasovki <i>S.cerevisiae</i>	33
Preglednica 13: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih kvasovke <i>S. cerevisiae</i> po dodatku Cr(III) ionov.....	35
Preglednic 14: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih kvasovke <i>S. cerevisiae</i> po dodatku Fe(III) in kombinaciji Fe(III)/Cr(III) ionov.....	37
Preglednica 15: Prikaz de novo sinteze proteinov pri vzorcih kvasovke <i>S. cerevisiae</i> po dodatku Fe(III) ionov in kombinacije Fe(III)/Cr(III).....	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram poteka dela.....	12
Slika 2: Vpliv Cr(III) ionov na znotrajcelično oksidacijo pri kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	31
Slika 3: Vpiv Cr(III) ionov na živost celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	32
Slika 4: Vpiv Fe(III) ionov in kombinacije Fe(III)/Cr(III) ionov na znotrajcelično oksidacijo pri kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	33
Slika 5: Vpiv Fe(III) ionov in kombinacije Fe(III)/Cr(III) ionov na živost celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	34
Slika 6: Proteinski profili ekstrakta celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> po tretiranju s Cr(III) in Fe(III) ioni in s kombinacijo obeh.....	35
Slika 7: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnem vzorcu.....	36
Slika 8: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu kvasovke <i>S. cerevisiae</i> po dodatku Cr(III) ionov.....	36
Slika 9: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnem vzorcu.....	39
Slika 10: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tretiranem z Fe(III) ioni.....	39
Slika 11: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tretiranem z Fe(III)/Cr(III) ioni.....	39
Slika 12: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D dimensyon.....	40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu:
maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₆₅₀	absorbanca ($\lambda = 650$)
BSA	goveji serumski albumin
CHAPS	(ang. 3-[(3-cholamidopropyl) dimetylammonio]-1-propanesulfonate)
Cr(III)	kromovi ioni ali spojine, v katerih je oksidacijsko št. 3
Da	Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g (enota za M _r proteinov)
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
Fe(III)	železovi ioni ali spojine, v katerih je oksidacijsko št. 3
FI	fluorescenčna intenziteta
IEF	izoelektrično fokusiranje (ang. isoelectric focusing)
M	mol/L
mM	10^{-3} mol/L
M _r	molekulska masa [Da]
M _w	molska masa (g/L)
MQ	miliQ (milipore) voda
min.	minuta
obr./min	obrati na minuto
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	standardna deviacija

SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	natrijev dodecil sulfat poliakriloamidna gelska elektroforeza (ang. sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis)
TEMED	tetrametiletildiamin
Tris-HCl	tris (hidroksimetil) aminometan z vodikovim kloridom
v/v	mL/100 mL
w/v	g/100 mL
YNB	gojišče (Yeast Nitrogen Base)
ZIM	Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov
2-D elektroforeza	dvo-dimenzionalna elektroforeza

1 UVOD

Velik problem sodobnega sveta je v nepravilni in neredni prehrani. Posledica tega je pomanjkanje esencialnih kovin v prehrani in s tem premajhna oskrbljenost organizma, kar pomeni velik problem za celotno in uspešno delovanje vseh življenjskih funkcij.

Minerali pomenijo 4,5 odstotka naše telesne mase, glavčina je v kosteh, kjer tudi ostanejo in jih ne moremo več izrabljati. Tudi sami ustvarjati jih ne moremo, zato jih moramo vse življenje vnašati s hrano. Pomembni so za tvorbo encimov, hormonov, hemoglobina, strukturnih beljakovin, vitaminov, pomembni za izražanje genov, prek teh pa vplivajo na pravzaprav vse sestavine človeškega organizma (Medić- Šarić in sod., 2002).

Za študij interakcij med posameznimi esencialnimi kovinami so kot modelni organizem najbolj primerne kvasne celice. Imajo status varnega organizma (GRAS-Generally Recognised As Safe), njihov metabolizem pa je na nekem nivoju primerljiv z metabolizmom in funkcijami višjih organizmov. Za naš poskus smo izbrali kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki je primerna zaradi hitre rasti na preprostih gojiščih, hitre izmenjave snovi z okoljem in dobro proučenega metabolizma. Kot drugi aerobni organizmi se tudi kvasovke soočajo s toksičnimi učinki reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom (nepopolna redukcija kisika med respiracijo). V normalnih razmerah rasti so endogeni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo količino ROS na ravni, neškodljivi za celico, in popravijo celične poškodbe.

Proteini so nosilci večine bioloških funkcij. Da bi razumeli, kako celice delujejo, je treba raziskovati, kateri proteini so navzoči, kje so, kako vstopajo v reakcije z drugimi molekulami in katere funkcije opravljajo med razvojem ali v različnih bolezenskih stanjih. Pojem proteom zajema celokupen nabor proteinov v neki celici, tkivu ali organizmu v nekem trenutku (Križaj, 2008).

1.1 NAMEN DELA

V nalogi smo skušali ugotoviti vpliv Fe(III) ionov, Cr(III) ionov in kombinacije obeh na celico na ravni proteoma v kontinuirnem sistemu.

Želeli smo pokazati, da pri dodatku koncentracije Fe(III) ionov ali Cr(III) ionov, ter kombinacije obeh pride do inhibicije rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

Ker sta železo in krom redoks aktivni kovini in imata pomembno vlogo pri tvorbi reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v celici, smo s pomočjo barvnega indikatorja in izmerjene intenzitete fluorescence ugotavljali obseg pojava oksidativnega stresa.

Izvedli smo tudi 2-D elektroforezo proteinov celičnega ekstrakta v območju molekulske mase 10 – 220 kDa in območju pH = 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev smo primerjali med sabo po 24 urni izpostavitvi z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI STRES

Celični odziv kvasovke na oksidativni stres in obrambne funkcije, ki so vključene v ta proces nam dajejo pomembno informacijo, za nadaljnje preučevanje in uporabo ustreznih metod. (Herrero in sod., 2008).

Oksidativni stres je definiran kot porušeno ravnotežje med nastajanjem reaktivnih kisikovih zvrsti in drugih prostih radikalov ter delovanjem antioksidantov, ki oksidante nevtralizirajo. Posledica zvečanega oksidativnega stresa je zvečana vsebnost reaktivnih kisikovih zvrsti v tkivih in celicah (Ikner in Shiozaki, 2005; Forsberg in sod., 2001).

Celica ima razvit obrambni encimski mehanizem za zaščito pred ROS. Pri nizkih koncentracijah se celica lahko prilagodi in postane odporna na poznejši letalni stres (Collinson in Dawes, 1992). Pri višjih koncentracijah celica aktivira zaščitne antioksidativne sisteme, vključujoč izražanje genov, transkripcijske faktorje in celične obrambne mehanizme (Payne in sod., 2008). Pri izredno visokih koncentracijah pa pride do apoptoze večine celic v populaciji, pri ekstremno visokih koncentracijah pride do nekroze (Perrone, 2008). Celice kvasovk *S. cerevisiae* imajo več encimov za obrambo pred ROS. Ena skupina encimov celice neposredno razstruplja, medtem ko druga skupina deluje kot redoks regulator proteinskih tiolov in pomaga k redoks ravnovesju v celici (Culotta in sod., 2006).

2.1.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, dušikom in žveplom (Sigler in sod., 1999). Reaktivne kisikove zvrsti nastajajo med metabolnimi procesi: pri redukciji molekularnega kisika med aerobno respiracijo in kot stranski produkt pri oksidaciji kateholaminov, pri aktivaciji arahidonske kisline, pri nastanku superoksida, hipoklorne kisline in dušikovega oksida. Med ROS prištevamo superoksidni anion, hidroksilni radikal, vodikov peroksid in peroksinitrit. V telesu nastajajo tudi drugi prosti radikali, npr. dušikovi prosti radikali (Murray in sod., 2008).

V homeostazi ROS sodelujejo pri regulaciji celičnih funkcij, čezmerno produkcijo ROS pa povezujejo s patogenezo številnih bolezni, kot so ateroskleroza, demenca in reperfuzijske okvare, pa tudi s staranjem povezane bolezni (Dröge, 2002; Kojda in Harrison, 1999).

Reakcija radikala z “neradikalom” (vse biološke makromolekule, kot so lipidi, proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati in druge molekule so možne “tarče”) sproži verižno reakcijo nastajanja novih prostih radikalov, ki lahko reagirajo z drugimi molekulami. Verižna reakcija se tako nadaljuje, “tarčne” molekule pa se okvarijo (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Kofaktorji večine encimov, ki proizvajajo kisikove radikale, so prehodne kovine, ki z lahkoto vežejo ali oddajajo elektrone. V bioloških sistemih imata največji pomen železo in baker (Štalcer in Ploj, 1993).

2.1.1.1 Superoksidni anion

Superoksidni anion nastane pri enoelektronski redukciji molekule kisika v mitohondriah (ubikinol-dehidrogenaza), endoplazemskem retikulumu (citokrom P450), v celičnih membranah vzbujenih fagocitov (NADH-oksidaža), v peroksisomih (oksidaža, flavoproteini), v plazemskih membranah (lipoksigenaze, oksidaze, prostaglandin sintetaze), z avtooksidacijo hemoglobina in mioglobina v metemoglobin in metmioglobin in na druge načine (Manček in Pečar, 2001).

Superoksidni anion ne povzroča peroksidacije lipidov in je slabo reaktiven, vendar lahko kljub temu povzroči inhibicijo glutation-peroksidaze delno pa tudi katalaze, ki spadajo med encime antioksidativne obrambe. Lahko tudi direktno reagira s Fe-S centri v aktivnih mestih encimov, kar povzroči inaktivacijo encimov in povečano koncentracijo železa v celici. Tako sproščeno železo lahko reagira z vodikovim peroksidom v Fentonovi reakciji, pri čem nastajajo hidroksilni radikali (Nordberg in Arnér 2001).

2.1.1.2 Vodikov peroksid

Dismutacija superoksidnega iona (vsak spontan ali kataliziran proces zaradi superoksidne dismutaze) tvori vodikov peroksid (H_2O_2), ki se s posebnimi peroksidazami popolnoma reducira do vode (Godon in sod., 1998). Vodik peroksid, v prisotnosti reducirajočih kovin, vstopa v reakcijo, kar povzroči nastanek hidroksilnega radikala ($\cdot OH$), enega izmed najmočnejših oksidantov v naravi. Če so v to reakcijo vpleteni kovinski ioni, je to Fentonova reakcija (Herrero in sod. 2008).

Po velikosti je molekula, podobna velikosti molekule vode. Ta lastnost in njegova nevtralnost mu omogočata vodi podobno gibljivost po tkivih. Čeprav niso zaznali nobene oksidativne spremembe DNA, lipidov in proteinov, ki so jih inkubirali z mM koncentracijo peroksida v odsotnosti Fe^{2+}/Cu^+ pa so nanj občutljivi predvsem encimi, ki imajo v aktivnem centru proste sulfhidrilne ($-SH$) skupine. Primer tega je gliceraldehid-3-fosfodehidrogenaza, ki jo vodikov peroksid z oksidacijo $-SH$ skupin inaktivira (Collinson in Dawes, 1992).

2.1.1.3 Hidroksilni radikal

Hidroksilni radikal je izredno reaktiven radikal, saj reagira skoraj z vsemi vrstami celičnih sestavin (lipidi in fosfolipidi, polisaharidi, proteini in nukleinskimi kislinami) po različnih poteh (Halliwell in Aruomab, 1991).

Če spojini odvzame H^{\cdot} nastane nov radikal z neparnim elektronom na ogljikovem atomu, ki lahko po reakciji s kisikom tvori reaktivni peroksilni radikal, le-ta pa je sposoben odvzeti H^{\cdot} iz metilenske skupine polinasičenih maščobnih kislin v biološki membrani, kar sproži proces lipidne peroksidacije (Ibrahim in sod. 2000).

Če odvzame H^{\cdot} deoksiribozi, pride do fragmentacije DNA, če pa vodikov atom izvira iz proteinov, je posledica spremenjena encimska aktivnost ali receptorska afiniteta do ligandov (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Hidroksilni ion v telesu nastaja na tri načine:

- v Fentonovi reakciji iz vodikovega peroksida
- s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi vode zaradi ionizirajočega sevanja
- in v reakciji superoksida s hipoklorno kislino, ki jo tvorijo mieloperoksidaze fagocitov.

2.1.2 Encimska zaščita celice pred ROS

Predstavljeni so le nekateri izmed encimov zaščite pred ROS.

2.1.2.1 Superoksid-dismutaza

Encim superoksid-dismutaza katalizira prehod superoksida v vodikov peroksid. Vodikov peroksid lahko reagira s prehodnimi kovinami, pri čemer nastajajo hidroksilni radikali ali pa preide v vodo s pomočjo glutathion peroksidaze (Cullota in sod., 2006).

Ker je glavni vir $O_2^{\cdot-}$ v kvasovkah mitohondrij, vsebujejo mitohondriji mitohondrijsko, mangan vsebujočo SOD (MnSOD). $O_2^{\cdot-}$ lahko nastaja tudi v citoplazmi, kjer odstranjevanje katalizira citoplazemska, baker in cink vsebujoča (Cu, ZnSOD) superoksid dismutaza (1) (Nordberg in Anér, 2001).



Superoksid-dismutaza je med encimi obrambnega sistema prvenum, ki s svojim delovanjem prepreči povečano koncentracijo superoksidnega aniona, prvega v verigi nastajanja ROS (Ibrahim in sod., 2000).

2.1.2.2 Katalaza

Katalaza, ki odstranjuje vodikov peroksid, je v kvasovkah vrste *S. cerevisiae* v peroksisomih (Cta 1) in v citoplazmi (Ctt 1) (Hiltunen in sod., 2003).

Katalaze sestavljajo večinoma štiri podenote, od katerih vsaka vsebuje hemsko skupino, vezano na aktivno mesto. Vodikov peroksid odstranjuje tako, da ga spremeni v vodo in kisik (2).



Če je navzoč stalen vir vodikovega peroksida, lahko katalaze katalizirajo tudi nekatere reakcije, ki jih sicer katalizirajo peroksidaze (oksidacijo alkoholov do aldehydov, nitrata v nitrit in dr.) (Manček in Pečar, 2001).

2.1.2.3 Glutation-peroksidaza

Glutation peroksidaza katalizira reakcijo med glutationom (GSH) in vodikovim peroksidom. Pri tem nastajata voda in glutation disulfid (GSSG) (Grant, 2001). Slednji se s pomočjo NADPH in glutation reduktaze reducira nazaj v GSH in krog je sklenjen (3).



In vivo glutation peroksidaza deluje tudi na številne lipidne hidroperoksidi (peroksid linolne in linolenske kisline, steroidni peroksidi, timinski hidroperoksidi), vendar le zunaj membrane (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.1.3 Neencimska zaščita celice pred ROS

Neencimski zaščitni faktorji so molekule z manjšo molekularno maso, topne v hidrofilnem ali lipofilnem okolju. Mednje sodijo: glutation, tioredoksin, askorbinska kislina, poliamini in trehaloza (Jamieson, 1998).

Glutation (GSH) je vodotopen tripeptid s prosto sulfhidrilno skupino (-SH) skupino. Je učinkovit lovilec hidroksilnih radikalov, reagira s singletnim kisikom, poleg tega je tudi substrat za glutation-peroksidazo.

Če je tkivo izpostavljeno večjim količinam vodikovega peroksida in/ali hidroksilnih radikalov, celice ne morejo več vzdrževati pravega razmerja med GSH in GSSG. Slednji se začne kopičiti in tvoriti mešane disulfide z encimi, kar lahko povzroči oksidativni stres (Jamieson, 1992).

2.2 KOVINSKI IONI IN OKSIDATIVNI STRES

Nekateri kovinski ioni so nujno potrebni za normalno delovanje celice, v večji koncentraciji pa celici škodujejo (Fridovich, 1995).

Čeprav so za celico v številnih biokemičnih reakcijah esencialni, so lahko v redoks reakcijah tudi toksični, ker tvorijo ROS. Porušenje celične homeostatske regulacije kovin (mednje sodita tudi krom in železo) vodi do oksidativnega stresa (O'Brein in sod., 2002).

ROS povzročijo oksidativne poškodbe proteinov, DNA in lipidov, kar ima za posledico tvorbo karbonilov, fragmentacijo proteinov, oksidacijo baz, nastanek enojnih in dvojnih lomov, nastanek lipidnih peroksidov in aldehydov. V normalnih pogojih se oksidativne poškodbe lahko popravijo, v pogojih oksidativnega stresa pa se nepravilno ali sploh ne popravijo, kar vodi v celično smrt (Paš in sod., 2006)

Oksidacijsko stanje in biorazpoložljivost redoks aktivnih kovinskih ionov sta ključni determinanti v njihovi sposobnosti za udeležbo pri nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti. Reducirane oblike redoks aktivnih kovinskih ionov sodelujejo v Fentonovi reakciji (4), kjer nastajajo hidroksilni radikali. Oksidirane oblike teh ionov pa reagirajo s superoksidnimi anioni (tudi z nekaterimi antioksidanti) v Haber-Weissovi reakciji (5), kjer nastanejo reducirane oblike kovinskih ionov, ki ponovno vstopajo v Fentonovo reakcijo (4) (Huang, 2003).



Fentonova/Haber-Weissova reakcija je prikazana na primeru železa, isti proces se zgodi tudi z drugimi redoks aktivnimi kovinami (Jamnik in sod., 2003).

Veliko eksperimentov potrjuje, da različne kovine proizvajajo ROS na različne načine (Shi in sod., 2004).

Cr(III) se veže s fosfatnimi skupinami DNA in povzroči nastanek stabilnih navzkrižnih povezav med molekulami DNA, med DNA in proteini, med DNA in aminokislinami ter nekaterimi drugimi ligandi. Količina navzkrižnih povezav se zmanjša ob navzočnosti antioksidantov (Mattagajasingh in Misra, 1999). V bioloških sistemih je možna tudi redukcija Cr(III) do Cr(II) v navzočnosti L-cisteina ali NADH (Ozawa in Hanaki, 1990).

2.3 METODE ZA SPREMLJANJE OKSIDATIVNEGA STRESNEGA ODGOVORA CELICE KVASOVK

Za spremljanje oksidativnega odgovora celice na stres je na voljo več metod, npr: spremljanje parcialnega tlaka med kultivacijo, vsebnosti neencimskih primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov, stresnega odgovora na nivoju transkriptoma, stresnega odgovora na nivoju proteoma, določanje živosti celic, uporaba različnih spektrofotometričnih in elektroforetskih metod merjenja aktivnosti encimov, ki so del primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov (Mager in Hohmann, 1997; Jamnik in Raspor, 2005).

Spremljamo aktivnost encimov, kot so: katalaze, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, glutation-reduktaze, glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, tioredoksin reduktaze, citokrom C-peroksidaze.

Vsebnost neencimskih primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov merimo z uporabo različnih spektrofotometričnih in kromatografskih metod. S temi metodami določamo: glutation, tioredoksin, metalotioni.

Spremljanje stresnega odgovora na nivoju transkriptoma, se izvaja z metodami analize, kot so: mRNK z metodo Northern, dopolnjena metoda Northern z dodatkom encima RNAaze, in situ hibridizacija, RT-PCR, DD PCR, serijska analiza genske ekspresije (SAGE), DNA mikromreže. Metoda spremljanja stresnega odgovora na nivoju proteoma je poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE).

2.4 ANALIZA PROTEOMA

Proteomika je študija celotnega seta proteinov, navzočih v celici, organizmu ali tkivu pod definiranimi pogoji in v nekem času (Kuiper in sod., 2003). Za razliko do genoma se proteom stalno spreminja in je odvisen od celičnega cikla (Ruebelt in sod., 2006). Proteomika proučuje proteine, ki so nosilci funkcij vsake žive celice (Lubec in sod., 2003). Skoraj vsi metabolni procesi vključujejo proteine, tudi signalizacija poteka prek proteinov in večina bolezni je povezana prav s spremembami v izražanju proteinov (Hershey in Merrick, 2000).

Proteom je dinamičen in se neprestano spreminja zaradi številnih dejavnikov znotraj in zunaj celice (Jamnik in Raspor, 2008).

Proteomika je zelo obetavna v identifikaciji proteinskih tarč in pri ovrednotenju matičnih celic bioloških bolezni. Zato ima pomembno vlogo pri razvoju zdravil.

Ob bolezenskih stanjih se pojavijo spremembe v ekspresiji proteinov na različnih nivojih. S študijo proteinskih sprememb znotraj celice med različnimi stanji celice (npr. zdravega v primerjavi z bolezenskim) je proteomika zagotovila vpogled v patofiziološko bazo proteinskih tarč, identifikacijo in vrednotenje bolezenskih stanj in njihovo zdravljenje (Hong in sod., 2006).

Proteomika v klasičnem pomenu pozna dva ključna koraka, separacijo proteinov iz celičnega ali tkivnega vzorca in njihovo identifikacijo. Zaenkrat še ne poznamo metode, s katero bi lahko na preprost način, v enem koraku identificirali in kvantificirali vse komponente kompleksnih proteinskih zmesi (Gasch in sod., 2000). Tako je treba proteinski vzorec najprej ločiti na posamezne komponente, šele temu sledi faza identifikacije in kvantifikacije. Pri separaciji kompleksnih proteinskih vzorcev sta se v množici postopkov v proteomiki uveljavila dva: poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) in tekočinska kromatografija (LC) (Križaj, 2008).

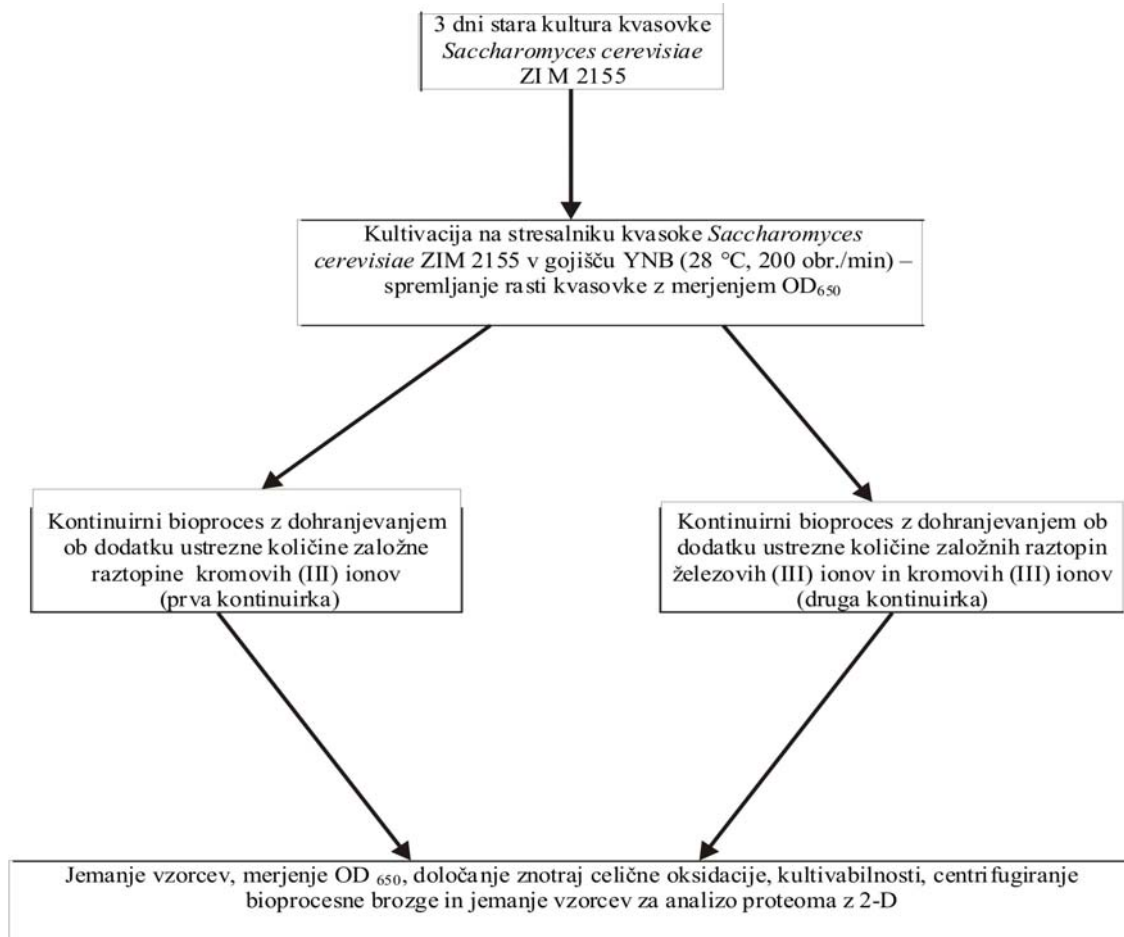
2.5 DELOVNA HIPOTEZA

Trdim:

- povišana koncentracija kromovih in/ali železovih zvrsti vpliva na spremembo v fiziologiji in tudi izražanju proteinskega profila.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 1: Hodogram poteka dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizem

Pri delu smo uporabili sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155), shranjenega v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Sev smo revitalizirali in vitalnost vzdrževali z rednim precepljanjem na trdno gojišče YNB.

3.2.2 Gojišča

Tekoče gojišče YNB smo uporabili za aerobno submerzno kultivacijo kvasovke na stresalniku (priprava inokuluma).

Preglednica 1: Sestava gojišča YNB brez aminokislin (Yeast, 2000)

sestavina	koncentracija (g/L)
NaCl (Sigma)	0,100
CaCl ₂ (Sigma)	0,100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma)	5,000
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	1,000
MgSO ₄ (Sigma)	0,500
inozitol (Sigma)	0,002

Preglednica 2: Priprava gojišča YNB za submerzno kultivacijo

sestavine	koncentracija (g/L)
brezvodna glukoza (Kemika)	2,5
YNB (Sigma)	1,675
dopolnimo z dH ₂ O do 250 mL	
bakteriološki agar (Biolife)*	

Legenda: * dodatek pri trdnem gojišču

YNB smo zatehtali v 100 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Filtrirali s filtrirno napravo in na ta način sterilizirali.

Glukozo smo raztopili v 150 mL destilirane vode in sterilizirali v avtoklavu na 121 °C in 1,2 bar 20 minut.

3.2.3 Reagenti in raztopine

3.2.3.1 Izpostavitve celic Cr(III) in Fe(III) ionom

Spojine Fe(III) za pripravo založne raztopine Fe(III) ionov s koncentracijo 1 M Fe(III):

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (p.a., min. 93,0 %, Merck)

Spojine Cr(III) za pripravo založne raztopine Cr(III) ionov s koncentracijo 0,5 M Cr(III):

- $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a., min. 93,0 %, Merck)

3.2.3.2 Določanje živosti

Za štetje celic smo uporabili fiziološko raztopino:

2,13 g NaCl (Merck) smo odtehtali v merilno bučko in dopolnili z dH₂O do 250 mL.

Sterilizirali smo in hranili na sobni temperaturi.

Pufer PBS smo uporabili pri določanje živosti celic.

10 x PBS (0,1 M PBS, pH = 7,2) (založna raztopina):

Na_2HPO_4 10,9 g

NaH_2PO_43,2 g

NaCl.....90 g

dH₂O.....dopolnili do 1000 mL

pH = 7,2

Raztopino smo hranili v hladilniku. Za pripravo 100 mL delovne raztopine smo s pipeto odvzeli 10 mL založne raztopine PBS-a ter z destilirano vodo dopolnili do oznake, nato jo sterilizirali 20 minut na 121 °C in nadtlaku 1,2 bar.

3.2.3.3 Določanje znotrajcelične oksidacije

50 mM fosfatni pufer (pH = 7,8) smo uporabili za določanje znotrajcelične oksidacije.

M_w (K_2HPO_4) = 175,9 g/mol

M_w (KH_2PO_4) = 136,9 g/mol za pripravo 50 mM fosfatnega pufru (pH = 7,8).

Obe raztopini smo pripravili do koncentracije 50 mM, ter ju zmešali skupaj po naslednjem postopku:

Raztopini K_2HPO_4 smo dolivali raztopi KH_2PO_4 s stalnim spremljanjem pH. Uravnavali smo do pH = 7,8.

Sledila je sterilizacija 20 minut pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,2 bar.

Priprava 1 mM izhodne raztopine barvila dihidro-2,7-diklorofluoroscein diacetata v 96 % etanolu (Jakubowski in Bartosz, 1997):

- dihidro-2,7-diklorofluoroscein diacetat (p.a., min. 97,0 %, Sigma)
- etanol (p.a., min. 96 %, Merck)
- cirkonij-kremenčkove kroglice

3.2.3.4 Priprava celičnega ekstrakta kvasovk

Preglednica 3: Pufer za ekstrakcijo proteinov

sestavine	količina	končna koncentracija
1 M raztopina Tris-HCl pH = 8,0	4 mL	40 mM
CHAPS (GE Healthcare)	2 g	2 % (w/v)
DTT (Sigma)	1 g	65 mM
dodali smo MQH ₂ O do 100 mL		
inhibitor proteaz (Compleat mini, Roche Diagnostics)		1 tabletko / 10 mL

- Priprava 1 M Tris-HCl pH = 8,0

Tris baza = 24,2 g, dodamo 150 mL MQH₂O in uravnavamo do pH = 8,0 s koncentrirano HCl.

Dopolnili z MQH₂O do 200 mL.

- Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu
 - NaCl (p.a., Merck) za pripravo 0,15 M vodne raztopine
 - Bradfordov reagent (BioRad)
 - Goveji serumski albumin (BSA) (Sigma)
- Čiščenje proteinov
 - Komplet - ("2-D Clean Up kit") (GE Healthcare)

3.2.3.5 2-D elektroforeza

1. dimenzija

Preglednica 4: Raztopina za rehidracijo trakov

sestavine	količina	končna koncentracija
CHAPS	0,2 g	2 % (w/v)
tiourea (Sigma)	1,52 g	2 M
urea (Sigma)	4,2 g	7 M
IPG pufer (GE Healthcare)	200 µL	2 % (v/v)
bromfenolmodro (Sigma)	1 kristalček	0,0002 % (w/v)
dodali smo MQH ₂ O do 10 mL		
*DTT	0,0056 g	65 mM

Alikvote po 2 ml hranimo na T = -20 °C

*DTT smo shranili v tri Ependorfove epruvete in dodali vzorcem pred samo rehidracijo trakov.

- mineralno olje (Sigma)

- Uravnoteženje trakov

Preglednica 5: Osnovni pufer za uravnoteženje trakov

sestavine	količina	končna koncentracija
glicerol (Sigma)	30 mL	30 % (v/v)
1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8	5 mL	75 mM
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
urea (Sigma)	36 g	6 M
bromfenolmodro (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)

dodali smo MQH₂O do 100 mL

100 mL ustreza za 4 trakove

- pufer za uravnoteženje I (65 mM DTT)

0,2 g DTT (Sigma) smo zatehtali v epruveto, ovito s folijo, in dodali 20 mL osnovnega pufera za uravnoteženje. Zmešali, da se raztopi in razdelili v dve epruveti.

- pufer za uravnoteženje II (260 mM JAA)

0,96 g jodoacetamida (Sigma) smo zatehtali v epruveto, ovito v folijo, in dodali 20 mL osnovnega pufera za uravnoteženje. Zmešali, da se raztopi in razdelili v dve epruveti.

2. dimenzija

Preglednica 6: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm

sestavine	količina		
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %) (Sigma)	15,7 mL	}	10 minut v ultrazvočni kopeli
1,5 M Tris – HCl pH = 8,8 (Sigma)	9,8 mL		
10 % (w/v) raztopina SDS (Sigma)	0,4 mL		
MQ H ₂ O	13,0 mL		
TEMED (Sigma)	13 µL		
10 % (w/v) APS (Sigma)	195 µl		

- Raztopine za pripravo ločilnega gela

- **10 % (w/v) raztopina SDS**

10 g SDS (Sigma), smo dodali ddH₂O do skupaj 100 mL raztopine.

- **1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8**

36,6 g Tris – baza (Sigma), smo dodali 150 mL ddH₂O in uravnavali pH na 8,8 s koncentrirano HCl, dopolnili z dd H₂O do skupaj 200 mL raztopine.

- **10 % (w/v) raztopina APS**

0,1 g APS (Sigma) smo dodali ddH₂O do skupaj 1 mL raztopine.

- SDS elektroforezni pufer

Preglednica 7: 1 x SDS elektroforezni pufer

sestavine	količina	končna koncentracija
glicin(Merck)	14,4 g	192 mM
Tris-baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,1 % (w/v)
dopolnimo MQH ₂ O do 1000 mL		

3.2.3.6 Detekcija proteinov na 2-D gelu

- fiksacijska raztopina
 - 100 % (v/v) metanola (Merck) 500 mL
 - 100 % očetne kisline (Merck) 70 mL
- SYPRO RUBY (Invitrogen)
- raztopina za razbarvanje
 - 100 % (v/v) metanola (Merck) 100 mL
 - 100 % očetne kisline (Merck) 70 mL

3.2.4 Oprema in aparature

- elektrode: pH, pO₂ (Ingold Mettler Toledo)
- vakuumska črpalka (VEB REGLER VERK)
- merilnik plinov CO₂ in O₂ (Echo)
- programska oprema za nadzor bioreaktorja: Shiva (Bia)
- peristaltične črpalke (Spectec 12, Gilson Miniplus 3, Chemap)
- sonda za vzorčenje (Eppendorf)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire 2 (Tecan)
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- multiphor II elektroforezna enota (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare)
- elektrodi (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- multiTemp III termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- vertikalni diskontinuirni elektroforezni sistem SE 600 1-Heoffer Scientific Instruments
- 1- mm distančniki
- steklene plošče
- zgornja in spodnja posoda z elektrodama
- hladilni sistem v obliki pretočnih cevi
- ultrazvočna kopel (Sonis Pio)
- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Gilson)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122)
- centrifuga (Eppendorf, 14000 vrt./min)
- digestorij
- hladilnik (LTH Škofja Loka)
- inkubator (BTES Frigomat)
- magnetno mešalo (Tehtnica Železniki 550 M)
- membranska filtrna naprava (Sartorius)
- mikroskop (Leica ATC 2000)

- mikrovalovna pečica (Candy)
- pH-meter (Mettler Toledo)
- rotacijski stresalnik (Mrzel)
- spektrofotometer (Iskra MA 9520 za merjenje optične gostote)
- sušilnik (Sutjeska)
- tehtnica (Sartorius analytic)
- tehtnica (Sartorius excellence)
- vodna kopel (Heto)
- zamrzovalna skrinja (LTH, Škofja Loka)

3.2.5 Steklovina in potrošni material

- 1,5-ml-Eppendorf centrifugirke
- 100-ml erlenmajerice
- 150-ml-in 1000-ml-erlenmajerice s stransko roko
- bakteriološke epruvete
- epruvete za centrifugiranje
- eksikator
- infuzijske steklenice
- merilne bučke
- merilni valji
- petrijeve plošče
- steklene kroglice (Sigma)
- števna ploščica (Bürker-Türk)

3.2.6 Programska oprema:

- Eurochrom 2000 (nadzor HPLC),
- Magellan,
- Microsoft Origin,
- Microsoft Office
- Sistem za dokumentacijo 2-D gelov (G:)
- Računalniški program za obdelavo gelov 2-D Dymension (Syngene)

3.3 METODE

3.3.1 Kontinuirni bioproces

Kontinuirni bioproces smo uporabili za natančnejšo preučitev vpliva Fe(III) ionov in kombinacije Fe(III) in Cr(III) ionov na metabolizem kvasovke *S. cerevisiae* v definiranih bioprocesnih pogojih v različno dolgih intervalih.

- Priprava inokuluma

Inokulum smo pripravili tako, da smo sterilno tekoče gojišče YNB cepili s tri dni staro kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* do optične gostote $\approx 0,20$ in pustili rasti kvasovke preko noči na stresalniku pri 200 vrt./min in 28 °C, da je OD₆₅₀ dosegla do 1,3. Inokulum zajema 10 % delovnega volumna brozge.

Bioreaktor in vse pomožne cevke smo sterilizirali 20 min z vodno paro pri 121 °C in nadtlaku 1,2 bar.

- Potek kontinuiranega bioprocesa:

V 1,5 L gojišča YNB s koncentracijo glukoze (10 g/L) smo inokulirali 150 mL inokuluma pod aseptičnimi pogoji.

Konstantni delovni volumen brozge v bioreaktorju (1,5 L) smo vzdrževali s senzorjem upora (Chemap), ki je bil povezan s peristaltično črpalko (Chemap) za iztok brozge iz bioreaktorja. Vtok svežega gojišča v bioreaktor je potekal s peristaltično črpalko (Gilson). V zgodnjem stacionarnem stanju aktivno rastoče kulture (OD₆₅₀ $\approx 1,3$) smo začeli z dohranjevanjem, hitrost dotoka svežega gojišča je bila 0,15 L/h, koncentracija glukoze v gojišču za dohranjevanje pa 6 g/L (S₀). Nastajanje pene v bioreaktorju smo preprečili tako, da smo v rezervoar svežega gojišča dodali protipenilec Acepol v koncentraciji 0,05 mL/L gojišča. Vrednost pH brozge smo vzdrževali na konstantni vrednosti 4,5 s pomočjo pH-elektrode in avtomatskim dodajanjem 0,5 M NaOH s pomočjo programa Shiva (Bia).

Koncentracijo raztopljenega kisika v gojišču smo spremljali s pomočjo kisikove elektrode in jo vzdrževali nad 60-odstotnim zasičenjem (vtok zraka 1,5 L/min). Merili smo tudi koncentracije izstopnih plinov (iztok plinov 1,5 L/min) iz bioreaktorja, in sicer z elektrokemijskim merilnikom O₂ in z infrardečim merilnikom CO₂ (Echo), ki smo ga poprej osušili v sušilniku zraka (Drierite, Hammond). S pomočjo dodanih cevk in peristaltične črpalke smo neposredno spremljali optično gostoto brozge z uporabo fotometra (Iskra).

V kontinuiranem bioprocesu smo spremljali naslednje parametre: pO₂, pH, CO₂, O₂, pretok zraka, OD₆₅₀ in vzorčili za kasnejše analize (proteinski profil, kulivabilnost, znotrajcelično oksidacijo, živost...).

3.3.2 Merjenje prirasta biomase s spremljanjem optične gostote brozge

Kultivacije na stresalnikih smo izvedli v Erlenmajerjevih posodah s stransko kiveto in spremljali rastne krivulje z merjenjem intenzitete prepuščene sipane svetlobe v fotometru (Iskra) pri valovni dolžini 650 nm, kar smo izrazili kot optično gostoto (OD₆₅₀). Podobno smo spremljali tudi rast vseh bioprocesov v bioreaktorju, kjer smo s pomočjo dodatnih cevk, peristaltične črpalke (Chemap) in fotometra (Iskra) neposredno spremljali OD₆₅₀ brozgo v bioreaktorju.

3.3.3 Ocena znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo smo določali z dodatkom fluorescenčnega indikatorja dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata (H₂DCFDA). H₂DCFDA se uporablja za določanje H₂O₂, hidroperoksidov in dušikovih oksidov ter za študije oksidativnega stresa na nivoju celice (Sigler in sod., 1999).

Dihidro-2,7-diklorofluorescein (H₂DCF) smo dodali kot diacetat, saj v tej obliki lažje prehaja v celico. Celice sprejmejo H₂DCFDA v citoplazmo s pasivno difuzijo, tam pa se s pomočjo nespecifičnih esteraz deacetilira do H₂DCF (Jakubowski in Bartosz, 1997). V tej obliki se barvilo zadržuje v celici, dokler se pod vplivom ROS ne oksidira do fluorescentnega 2,7-diklorofluorescein 9-laktone (DCF_L).

Dihidro-2,7-diklorofluorescein (H₂DCF): 0,0049 g smo zatehtali v epruveto, dodali 10 mL 96 % etanola zaščitili pred svetlobo. Ko se je barvilo raztopilo, smo s pipeto dodali 1 mL barvila na 100 mL brozge in inkubirali 15 min v temi.

Nato smo brozgo 5 min centrifugirali pri 4000 vrt./min, odlili supernatant, zatehtali 50 mg biomase v centrifugirno epruveto, respendirali v 500 µL fosfatnega pufra (mrzlega), dodali kroglice (cirkonij/kremenčeve) zmešali na vorteksu 1 min, inkubirali na ledu 1 min, (vse ponovili trikrat) centrifugirali pri T = 4 °C in 13 000 vrt./min. Supernatant smo odpipetirali v novo centrifugirno epruveto, razredčili 10-krat z sterilno MQ H₂O injicirali po 200 µL na mikrotiterske ploščice, kjer smo s čitalcem mikrotiterskih plošč Safire II izmerili fluorescenco in rezultat izrazili kot FI. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm, emisije pa 520 nm (Jamnik in sod., 2006).

3.3.4 Določanje živosti celic

Živost celic smo določali s pomočjo komercialnega kompleta, ki vsebuje dve barvili SYTO[®] 9 in propidijev jodid (Haugland, 2002). Komplet omogoča hitro in kvantitativno detekcijo med živimi in mrtvimi kvasnimi celicami.

1 mL brozge smo centrifugirali 3 min. pri 12 000 vrt./min., sprali z 1 mL PBS, odlili supernatant, ponovno smo dodali 1 mL PBS in pod mikroskopom prešteli celice. Ustrezna koncentracija je 10⁶ celic/mL, če je koncentracija večja, vzorec smo razredčili (100 µL vzorca s 900 µL PBS). Vzorcju z ustrešno koncentracijo smo dodali 1 µL barvila in 1 µL propidijevega jodida, inkubirali 20 min. pri T = 37 °C. Po inkubaciji smo injicirali vzorce na mikrotiterske ploščice, nato smo s čitalcem mikrotiterskih plošč Safire II izmerili fluorescenco in smo rezultat izrazili kot FI. Valovni dolžini vzbujanja in emisije se pri barvilih razlikujeta: tako, da je valovna dolžina vzbujanja pri barvilu Syto[®] 9 488 nm, emisije pa 530 nm, pri barvili propidijev jodidi pa valovna dolžina vzbujanja 488 nm, emisije pa 530 nm.

Barvilo Syto[®]9 detektira poškodovane in intaktne celice in prodre do nukleinskih kislin, s katerimi ustvari kompleks, ki fluorescira, medtem ko propidijev jodid barva samo poškodovane celice, saj lahko prehaja samo preko poškodovane membrane.

Barvili smo hranili na $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pred uporabo smo ju odtajali na sobni temperaturi in ju zaščitili pred svetlobo.

3.3.5 Priprava celičnega ekstrakta za analizo proteinov

3.3.5.1 Razbijanje celic:

- Biomaso smo odtajali na ledu
- Dodali smo cirkonij-kremenčeve kroglice in pufer za ekstrakcijo; biomasa : pufer : kroglice = (0,5 – 0,7 g) : (2,5 – 3 mL) : 3 g (3 žličke)
- Razbijali smo celice 5-krat po 1 minuto na vrtičniku z vmesnimi 1-minutnimi intervali na ledu
- Homogenat smo centrifugirali 20 minut z 20 000 g pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.5.2 Merjenje koncentracije proteinov

Za določanje koncentracije proteinov v vzorcu smo uporabili kot standard goveji serumski albumin (BSA) s koncentracijo 2 mg/mL in narisali umeritveno krivuljo.

S pipeto smo od vsakega vzorca odvzeli 50 μL supernatanta in dodali po 2,5 mL Bradfordovega reagenta (5-krat redčenega) za določanje koncentracije proteinov. Nato smo 200 μL mešanice (vzorec + Bradfordov reagent) s pipeto dodali na mikrotitersko ploščo in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Rezultat smo primerjali z umeritveno krivuljo in odčitali koncentracijo proteinov v vzorcu, ter ustrezno redčili do koncentracije proteinov 1 g/L.

3.3.5.3 Čiščenje proteinov v celokupnem proteinskem ekstraktu s kompletom "2-D Clean Up kit" (GE Healthcare)

Za čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu smo uporabili komplet "2-D Clean Up Kit" (GE Healthcare). Postopek čiščenja temelji na obarjanju proteinov in odstranjevanju motečih snovi, kot so detergenti, soli, lipidi, fenoli in nukleinske kisline. Očiščene proteine po čiščenju smo raztopili v raztopini za rehidracijo trakov.

Čistili smo po navodilu proizvajalca in sicer:

- vzorec smo prenesli v centrifugirne epruvete
- glede na volumen vzorca smo dodali 3-kratni volumen precipitanta, mešali na vrtilniku in vzorec 15 minut inkubirali na ledu
- dobljeni mešanici vzorca in precipitantna smo dodali 3-kratni volumen koprecipitanta glede na volumen prvotnega vzorca
- centrifugirali pri 8000 g 10 minut pri $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- s pipeto smo previdno odstranili supernatant, sedimenta nismo smeli resuspendirati
- dodali smo 80 μL koprecipitanta (volumen je bil tolikšen, da je prekrival sediment) nato inkubirali na ledu 5 minut
- centrifugirali smo pri 8000 g 5 minut pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, odstranili smo supernatant
- dodali smo 50 μL ddH₂O (toliko, da prekrije sediment), mešali na vrtilniku, dokler se sediment ni resuspendiral
- dodali smo 1 mL pufra za izpiranje, ki smo ga poprej vsaj eno uro hladili pri $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5 μL aditiva, vse skupaj mešali na vrtilniku (sediment se ne rastopi, ampak resuspendira)
- zmes pri $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo inkubirali 30 minut, mešali na vrtilniku vsakih 10 minut po 20-30 sekund
- centrifugirali smo pri 10 000 g 10 minut pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- odstranili smo supernatant (sediment mora biti bel), sušili na zraku največ 5 minut

- sediment smo raztopili v raztopini za rehidracijo trakov in mešali na vrtilniku, dokler se sediment popolnoma ni raztopil, nato smo pustili na sobni temperaturi 2 minuti
- centrifugirali smo pri 8000 g 10 minut pri $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, supernatant smo nanесли na gel za 1. dimenzijo 2-D elektroforeze ali shranili pri $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nanosa na gel.

3.3.6 2-D elektroforeza

2-D elektroforeza vključuje ločevanje proteinov v dveh dimenzijah. V prvi dimenziji poteka izoelektrično fokusiranje. Proteini se ločijo na podlagi izoelektrične točke, v drugi dimenziji pa po velikosti glede na molekularno maso (SDS-PAGE) (Nelson in Cox, 2000). Pri proteomskih študijah nam kombinacija obeh omenjenih dimenzij omogoča visoko ločljivost in analizo razlik v sintezi proteinov, nadalje spreminjanje globalne sinteze in preverjanje čistosti proteinov med izolacijo (Sarma in sod., 2008).

2-D elektroforezo smo izvedli na podlagi metode, O' Farrell (1975) z modifikacijo 1. dimenzije, Görg (1991). Modifikacija vključuje uporabo komercialnih trakov z imobiliziranimi pH gradienti.

1. dimenzija

Metoda zajema :

- rehidracijo trakov
 - izoelektrično fokusiranje – IEF
-
- Rehidracija trakov

Za analizo smo uporabili trakove, z imobiliziranim pH gradientom (4 - 7), dolge 13 cm, ki smo jih hranili pri $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za rehidracijo smo uporabili podstavek s režami in pokrovom. Uravnavali smo podstavek v ravnotežno pozicijo, nato v sredino reže s pomočjo pipete dodali 250 μL raztopine za rehidracijo trakov, ki je že vsebovala vzorec.

Z anodnega konca traku (+) smo odstranili zaščitno folijo, ki prekriva gel in ga previdno, brez tvorbe mehurčkov, položili z gelom navzdol v režo ter prekrili z 2,5 mL mineralnega olja. Podstavek smo nato prekrili s pokrovom in pustili 13 ur, da se trakovi rehidrirajo.

- Izoelektrično fokusiranje

Po končani rehidraciji trakov smo le te narahlo sprali z MQ vodo in jih nato z gelom na zgornji strani traku osušili na papirju za filtriranje.

Na ploščo s stalno $T = 20\text{ °C}$ smo nanесли med izoelektričnim fokusiranjem 3-4 mL mineralnega olja in čezenj postavili steklen podstavek z električnimi priključki, tako da je anodni priključek bil nameščen na vrhu plošče. V podstavek smo nalili 10 mL mineralnega olja in dodali plastično ploščo z vdolbinami, v katere smo položili trakove z gelom navzgor in pozitivnim koncem na zgornjem delu plošče. Nato dva enako dolga elektrodna trakova smo namočili v MQ vodo, ju malo osušili na papirju za filtriranje, položili smo pravokotno na oba konca trakov in čez njiju namestili elektrodi. Trakove smo nato prelili s približno 230 mL mineralnega olja.

Pogoji pri izoelektričnem fokusiranju (način "gradient") so bili pri $T = 20\text{ °C}$ naslednji:

1. faza	300 V	1 min
2. faza	3500 V	1 h in 30 min
3. faza	3500 V	4 h in 20 min

Po končanem IEF trakove smo shranili v plastični mapi pri $T = -80\text{ °C}$ do izvedbe 2. dimenzije.

2. dimenzija

Metoda zajema več korakov:

- vlivanje gelov,
 - uravnoteženje trakov,
 - prenos traku na ločilni gel,
 - SDS-PAGE
-
- Vlivanje gelov

Med stekleni plošči, ki skupaj tvorita kalup, smo vlili ločilni gel (19 mL za en gel) z ustrešno koncentracijo akrilamida. Na zgornjo površino gela smo nanесли z mikropipeto tenko plast MQ vode, ki gelu preprečuje stik z zrakom. To omogoča enakomerno polimerizacijo. Ko je gel po 2 urah ali do naslednjega dne polimeriziral, smo vodo odlili in površino gela osušili s fenom.

- Uravnoteženje trakov

Trakove z gelom smo vzeli iz zamrzovalnika, jih prenesli v epruvete z 10 mL pufra za uravnoteženje I in jih dali na stresalnik za 15 minut. Medtem smo pripravili dva papirčka za filtriranje in dodali 5 μ L markerja, ki je bil shranjen v zamrzovalniku na $T = -20$ °C in ogret na $T = 37$ °C.

Trakove smo prenesli iz pufra za uravnoteženje I v epruvete z 10 ml pufra za uravnoteženje II in jih dali na stresalnik za nadaljnjih 15 minut. Agarozno raztopino smo iz stanja sol segreli do stanja gel v vodni kopeli pri $T = 80$ °C. Po uravnoteženju trakove smo prenesli na papir za filtriranje (z gelom navzgor).

- Prenos trakov na ločilni gel

Papirček za filtriranje z markerjem smo počasi spustili v levi vogal stojala z ločilnim gelom, če je bilo treba, smo ga na koncu z iglo pomaknili v vogal. Ob desni rob smo počasi dolili agarozno raztopino in pazili, da se papirček z markerjem ne bi premaknil. Trakove smo vzeli iz pufra za uravnoteženje II, jih sprali z MQ vodo ter jih na papirju za filtriranje nekoliko posušili.

En trak smo previdno dodali v kalup z ločilnim gelom in ga pomikali bolj proti desni strani stojala. Pustili smo, da agarozna raztopina preide v stanje sol.

- SDS-PAGE

Proces poteka v posodi, napoljnjeni z 1-kratnim elektroforeznim pufrom SDS, v katerega smo položili stojalo z gelom. Vzorci potujejo s sprotnim hlajenjem v smer anode, najprej 15 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel in nato pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler marker ne doseže spodnjega roba gela.

3.3.7 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

Gele smo barvali z barvilom SYPRO RUBY.

3.3.7.1 Barvanje 2-D gelov z barvilom SYPRO RUBY

Preglednica 8: Potek barvanja 2-D gelov z barvilom SYPRO RUBY

korak	raztopina	čas
fiksacija	200 mL fiksacijske raztopine (fix solution)	2-krat po 30 minut
barvanje	200 mL barvila SYPRO RUBY	24 ur
razbarvanje	200 mL raztopine za razbarvanje (wash solution)	2-krat po 30 minut
izpiranje	200 mL MQ H ₂ O	3-krat po 5 minut

200 mL ustreza za en gel.

3.3.7.2 Slikanje gelov in računalniška obdelava slike

Gele smo slikali z uporabo GBOX: HR (Syngene). Parametri pri slikanju so bili: fokus-minimum, zoom kamere-minimum, čas izpostavitve: 50 ms.

Gele smo po slikanju računalniško obdelali s programom 2-D Dymension (Syngene). S tem programom lahko primerjamo več gelov med sabo. Kontrolni vzorec (gel) postavimo kot primerjalnega (z njim primerjamo vse ostale gele).

Program določi točno lego 2-D lis (jih obkroži) in kvantitativno ovrednoti vsako liso na podlagi normaliziranega volumna. Temu sledi ujemanje in primerjava lis med geli.

Dobimo tudi preglednico s številkami lis, ki predstavljajo isto liso na vseh gelih in njihovo razmerje normaliziranih volumnov glede na kontrolni gel (relativne vrednosti). Normaliziran volumen pomeni razmerje med volumnom ene lise glede na celokupen volumen vseh lis na gelu. Ujemanje lis na gelih smo preverili z ročnim pregledovanjem slike.

4 REZULTATI

Na podlagi delovne hipoteze, da povišana koncentracija kromovih in/ali železovih zvrsti vpliva na spremembo v fiziologiji in tudi izražanju proteinskega profila, smo preučevali vpliv 0,1 mM Fe(III), 2,5 mM Cr(III) in kombinacije obeh na kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v kontinuirnem bioprocesu po določenem času. Spremljali smo živost, znotrajcelično oksidacijo in izražanje proteinov z 2-D elektroforezo.

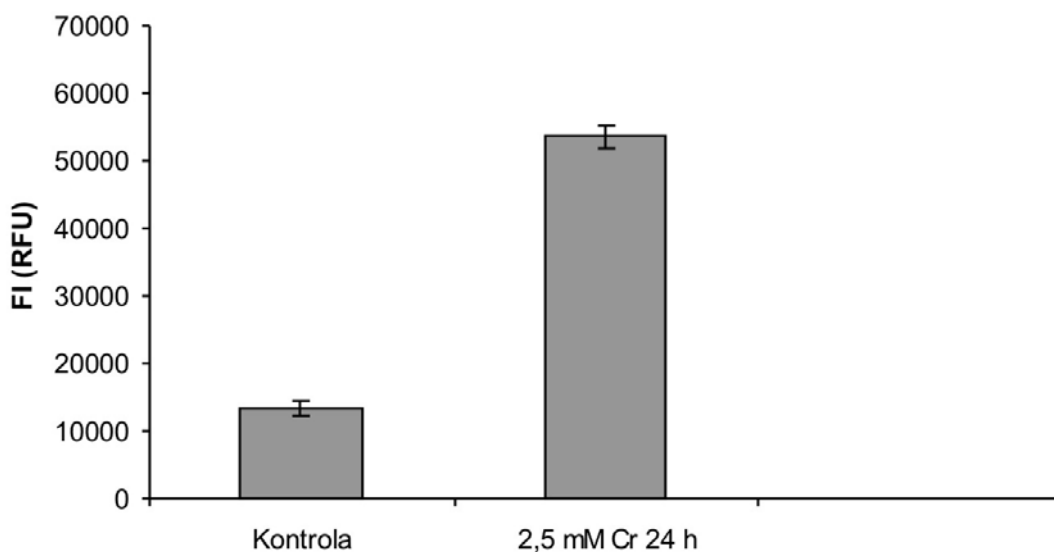
V nadaljevanju so predstavljeni rezultati praktičnega dela, ki je potekalo od 30. marca do 12. julija 2007. V tem času smo opravili 620 ur laboratorijskega dela.

4.1 VPLIV Cr(III) IN Fe(III) NA ŽIVOST IN ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO

Po 24 urni izpostavitvi celic Cr(III) ionom se je vsebnost ROS 4-krat povečala, živost se je pa zmanjšala za 1,7-krat glede na kontrolo (Preglednica 9 in 10, Slika 2 in 3).

Preglednica 9: Določanje znotrajcelične oksidacije po dodatku Cr(III) ionov pri kvasovki *S. cerevisiae*

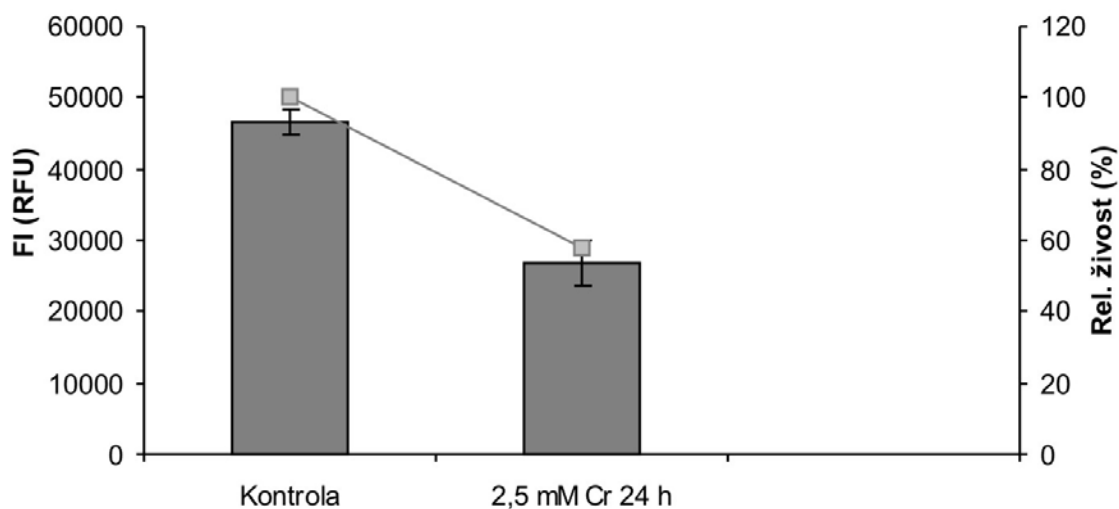
	FI (RFU)	SD
kontrola	13267,2	1107,4
2,5 mM Cr(III)	53553,7	1625,2



Slika 2: Vpliv Cr(III) ionov na znotrajcelično oksidacijo pri kvasovki *S. cerevisiae*

Preglednica 10: Določanje živosti po dodatku Cr(III) ionov pri kvasovki *S. cerevisiae*

	FI (RFU)	SD	rel.živost
kontrola	46520,8	1872,5	100,0
2,5 mM Cr(III)	26783,7	3243,5	57,6

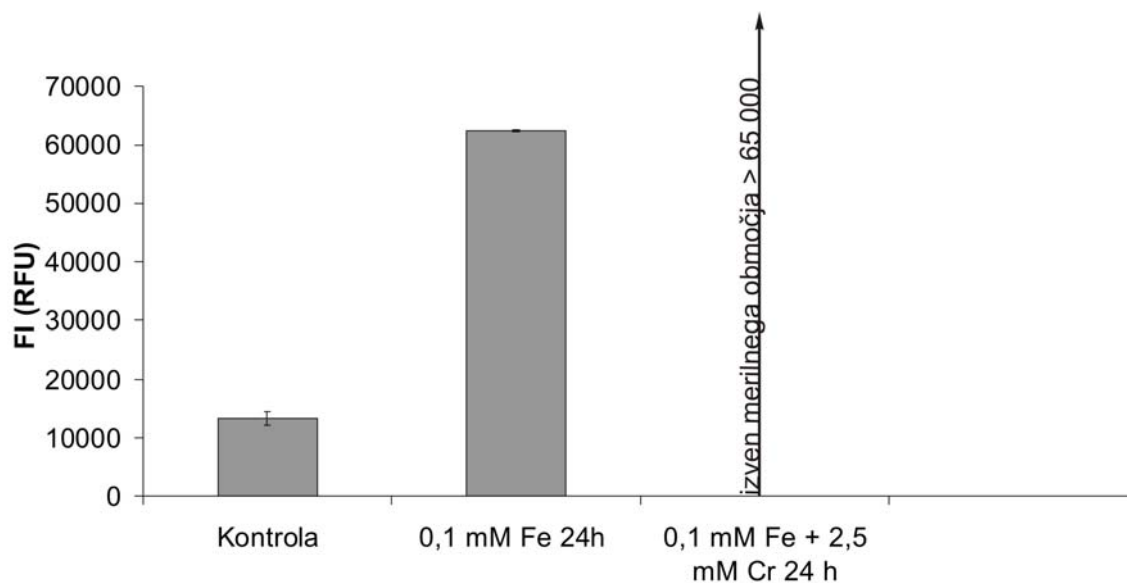


Slika 3: Vpliv Cr(III) na živost celic kvasovke *S. cerevisiae*

V drugem delu poskusa smo kulturo najprej izpostavili 0,1 mM Fe(III) ionom, kar je povzročilo 4,7-kratni dvig ROS in 1,8-kratno zmanjšanje živosti, po naknadni izpostavitvi 2,5 mM Cr(III) je bila vsebnost ROS izven merilnega območja, živost je bila 2,7 %, glede na kontrolo (Preglednica 11 in 12, Slika 4, 5).

Preglednica 11: Določanje znotrajcelične oksidacije po dodatku Fe(III) inov in kombinacije Fe(III)/Cr (III) pri kvasovki *S. cerevisiae*

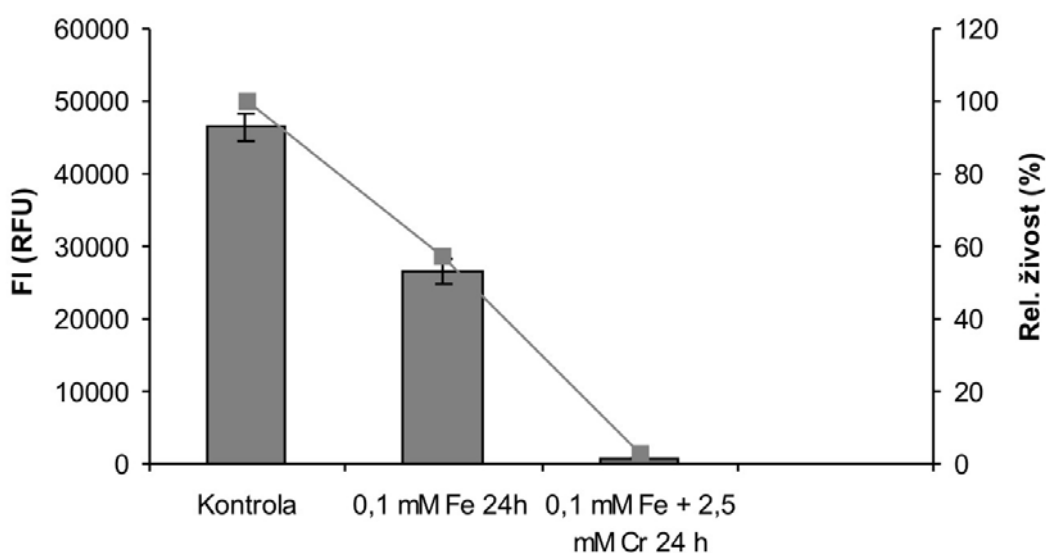
	FI (RFU)	SD
kontrola	13267,2	1107,4
0,1 mM Fe(III)	62335,0	159,8
0,1 mM Fe (III)/ 2,5 mM Cr (III)	izven merilnega območja	/



Slika 4: Vpliv Fe(III) in kombinacije Fe(III)/Cr(III) ionov na znotrajcelično oksidacijo pri kvasovki *S. cerevisiae*

Preglednica 12: Določanje živosti po dodatku Fe(III) inov in kombinacije Fe(III)/Cr(III) ionov pri kvasovki *S. cerevisiae*

	FI (RFU)	SD	rel.živost
kontrola	46520,8	1872,5	100,0
0,1 mM Fe (III)	26497,3	1834,7	56,9
0,1 mM Fe(III)/ 2,5 mM Cr(III)	732,6	79,5	2,7



Slika 5: Vpiv Fe(III) in kombinacije Fe(III)/Cr(III) ionov na živost celic kvasovke *S. cerevisiae*

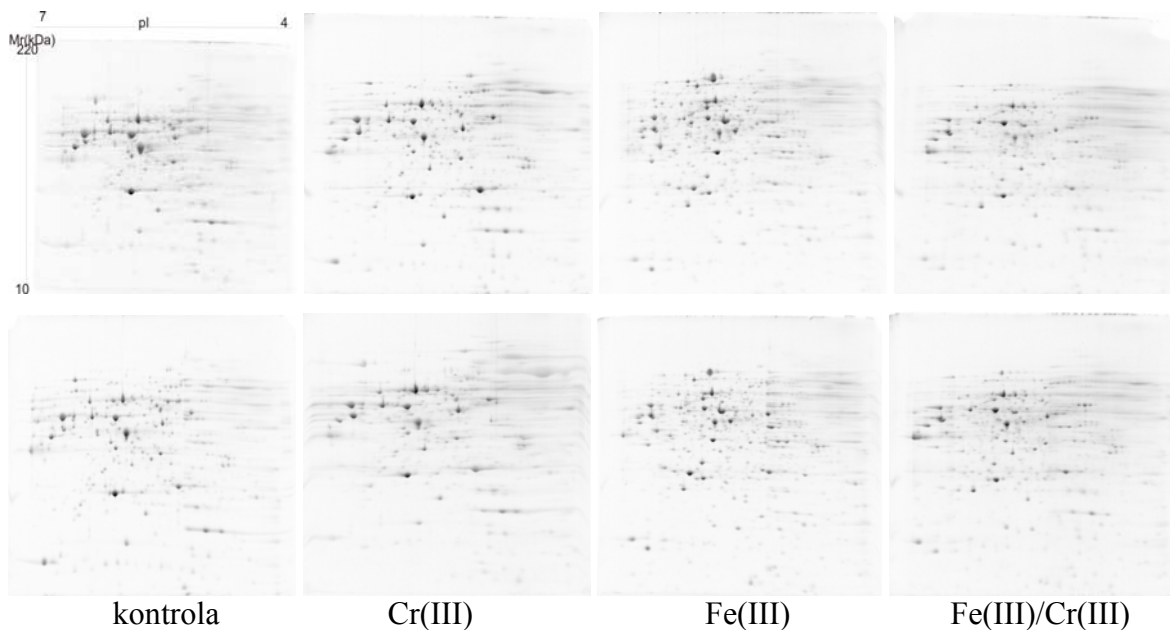
4.2 VPILV Cr(III) IN Fe(III) NA IZRAŽANJE PROTEINOV

Vzorcem smo pred 2-D elektroforezo, izmerili koncentracijo proteinov ki je bila sledeča:

- Kontrolni vzorec = 3,2 g/L
- Vzorec po dodatku Cr(III) ionov = 4,0 g/L
- Vzorec po dodatku Fe(III)ionov = 4,7 g/L
- Vzorec tretiran s Fe(III) po dodatku Cr(III) = 1,6 g/L

Vzorci smo ustrezno čistili in nanесли na trakove za izoelektrično fokusiranje ter izvedli 2-D elektroforezo.

Ločevanje proteinov je potekalo v območju molekulske mase 10 – 220 kDa in območju pH 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev (po izpostavitvi Cr(III) ionov, Fe(III) ionov in naknadni izpostavitvi Cr(III) po tretiranju s Fe(III) ioni) smo primerjali glede na kontrolo z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension.



Slika 6: Proteinski profili ekstrakta celic kvasovke *S. cerevisiae* po tretiranju s Cr(III) in F(III) ioni in s kombinacijo obeh

Po 24-urni izpostavitvi kulture Cr(III) ionom ni prišlo do izrazite spremembe proteinskega profila glede na kontrolni vzorec. Opazili smo represijo sinteze nekaterih proteinov (Preglednica 13, Slika 7 in 8).

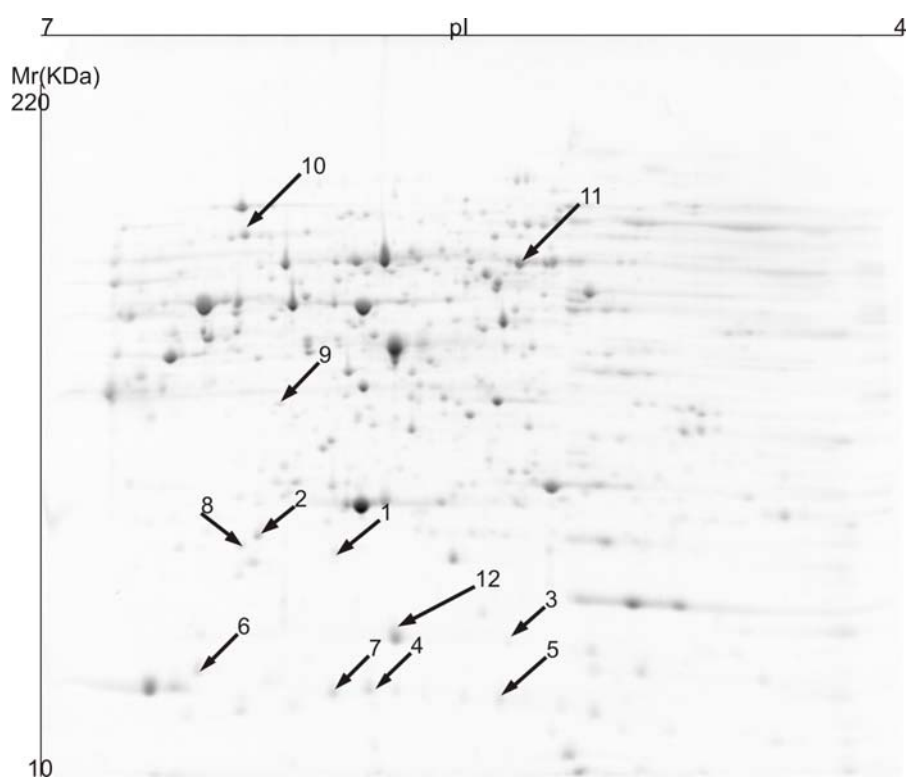
Preglednica 13: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih kvasovke *S. cerevisiae* po dodatku Cr(III) ionov

št. lise	Cr(III)			
	indukcija sinteze		represija sinteze	
	R	p	R	p
1	/	/	-3,012	0,030
2	/	/	-3,974	0,026
3	/	/	-2,361	0,015

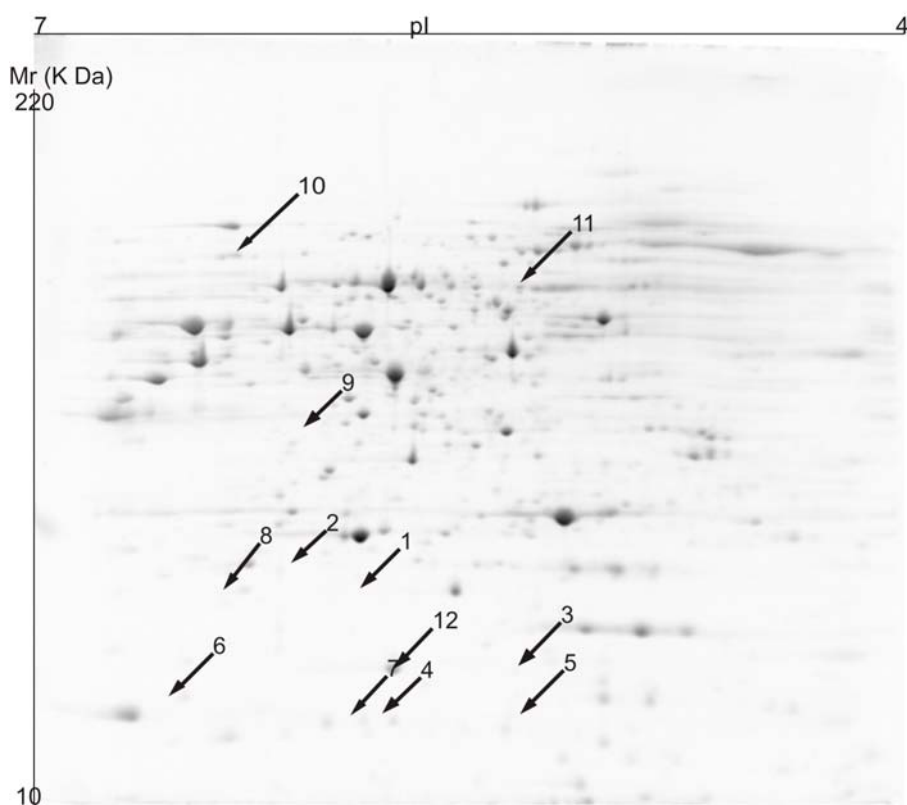
R = relativne vrednosti (razmerje normaliziranih volumnov)

P = stopnja verjetnosti (Adamič, 1998).

Devet lis (št.: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), ki smo jih opazili na kontrolnem vzorcu, nismo več zaznali na vzorcu izpostavljenem vplivu Cr(III) ionom (slika 7 in 8).



Slika 7: Prikaz izražanja proteinov na kontrolnem vzorcu




Slika 8: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu kvasovke *S. cerevisiae* po dodatku Cr(III) ionov

Pri drugi kontinuirki smo kulturo najprej tretirali z Fe(III) in smo po 24 urah opazili bolj očitno razliko glede na kontrolni vzorec. Opazili smo indukcijo in represijo sinteze proteinov, kot tudi sintezo novih (Slika 9 in 10).

Po 24 urah smo vzorec tretirali še s Cr(III) ioni in smo opazili še večjo razliko glede na kontrolo. Vidno je bilo nadaljevanje represije sinteze proteinov (Preglednica 14, Slika 9, 10 in 11) in sinteza novih glede na kontrolni vzorec (Preglednica 15, Slika 9, 10 in 11).

Preglednica 14: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcih kvasovke *S. cerevisiae* po dodatku Fe(III) in kombinacijo Fe(III)/Cr(III) ionov

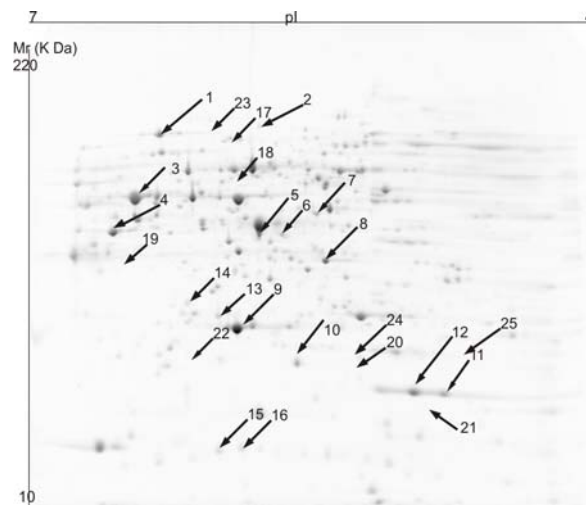
št. lise	Fe(III)				Fe(III)/Cr(III)			
	represija sinteze		indukcija sinteze		represija sinteze		indukcija sinteze	
	R	p	R	p	R	p	R	p
1	- 3,532	0,004	/	/	- 5,049	0,025	/	/
2	/	/	17,113	0,006	- 2,523	0,021	/	/
3	- 2,309	0,020	/	/	- 3,170	0,026	/	/
4	- 3,172	0,011	/	/	- 2,117	0,030	/	/
5	- 2,348	0,006	/	/	- 2,137	0,051	/	/
6	/	/	4,392	0,0003	/	/	1,971	0,048
7	/	/	1,925	0,026	- 2,295	0,026	/	/
8	- 4,060	0,018	/	/	- 2,835	0,034	/	/
9	- 3,033	0,001	/	/	- 1,893	0,005	/	/
10	- 2,297	0,008	/	/	- 1,739	0,016	/	/
11	- 4,081	0,006	/	/	- 2,228	0,047	/	/
12	- 3,529	0,001	/	/	- 1,805	0,032	/	/
13	/	/	5,864	0,030				
14	-1,520	0,006	/	/				
15	-3,05	0,045	/	/				
16	-2,092	0,025	/	/				

 Prisotni na kontroli in Fe(III), odsotni na Fe(III)/Cr(III)

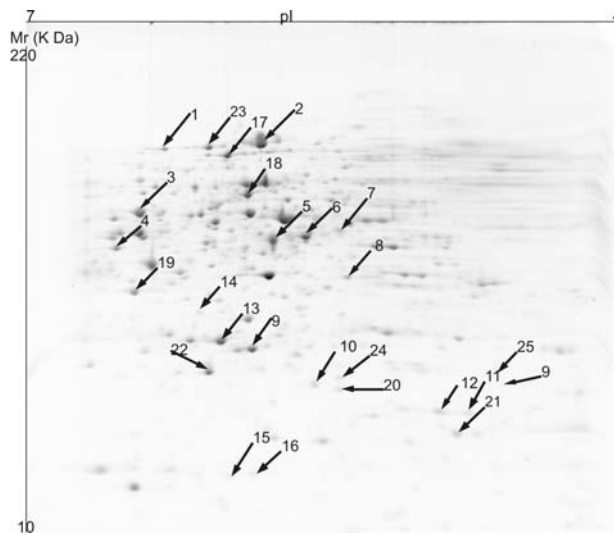
Preglednica 15: Prikaz de novo sinteze proteinov pri vzorcih kvasovke *S. cerevisiae* po dodatku Fe(III) in kombinacije Fe(III)/Cr(III)

št. lise	Fe(III)		Fe(III)/Cr(III)	
	de novo sinteza		de novo sinteza	
	R	p	R	p
17		0,048		0,048
18		0,022		0,022
19		0,017		0,017
20		0,052		0,052
21		0,037		0,037
22		0,002		0,002

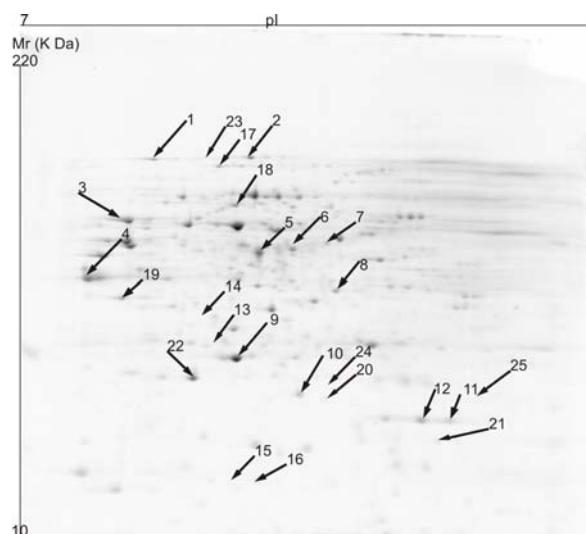
Tri novo sintetizirane lise (št.: 23, 24, 25), ki smo jih opazili na vzorcu tretiranem z Fe(III), nismo zaznali pri vzorcu tretiranem še s Cr(III) (Slika 9, 10 in 11).



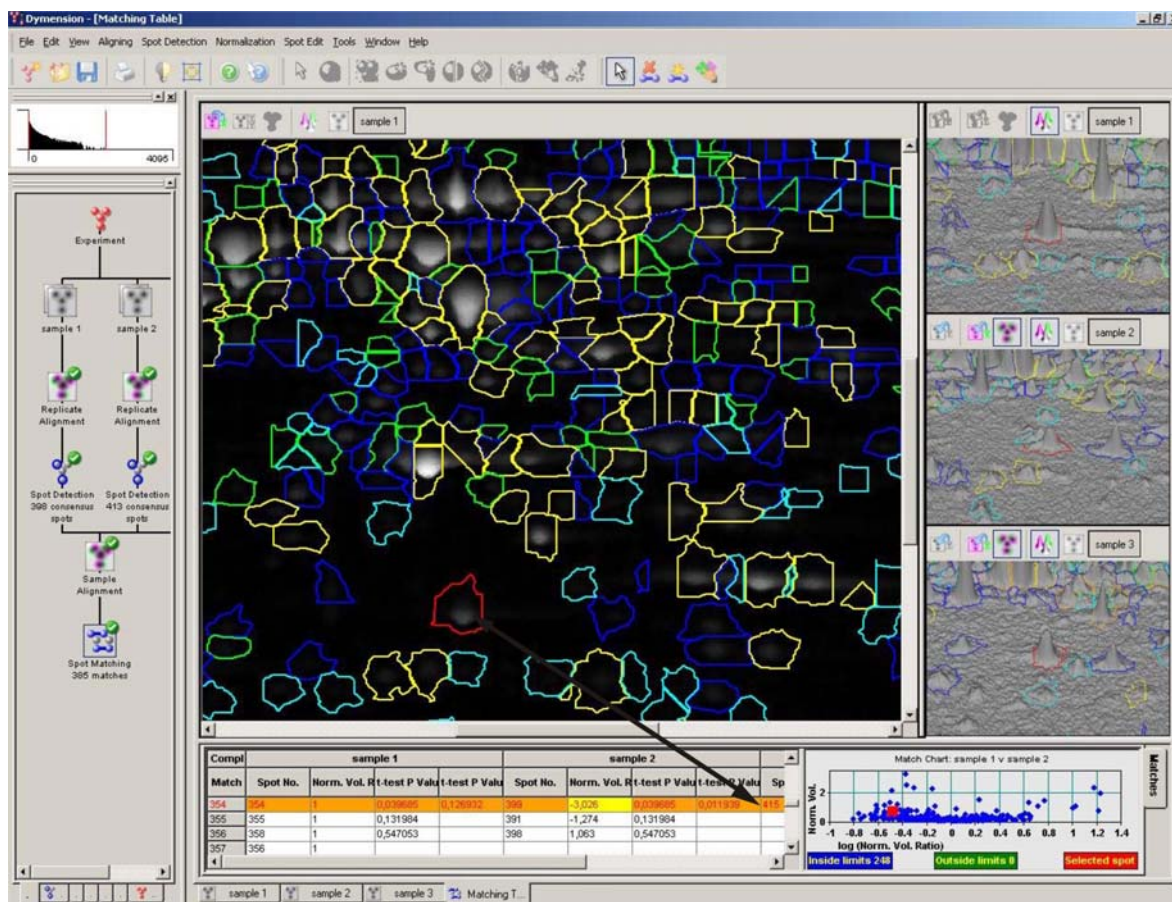
Slika 9: Prikaz izražanja proteinov pri kontrolnem vzorcu



Slika 10: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu kvasovke *S. cerevisiae* tretiranem z Fe(III) ioni



Slika 11: Prikaz izražanja proteinov pri vzorcu kvasovke *S. cerevisiae* tretiranem z Fe(III)/Cr(III) ioni



Slika 12: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D dimensyon

5 RAZPRAVA IN SKLEPI.

Izhajali smo iz delovne hipoteze, da povišana koncentracija kromovih in/ali železovih zvrsti vpliva na spremembo v fiziologiji in tudi izražanju proteinskega profila.

5.1 RAZPRAVA

Minerali so esencialnega pomena za pravilno delovanje vseh živih celic. Različne interakcije med esencialnimi elementi pa lahko privedejo do pomanjkanja ali toksičnega učinka posameznega elementa v celici. Med omenjene elemente, ki sodelujejo v celičnem metabolizmu, uvrščamo tudi krom in železo. Medtem ko ima krom pomembno vlogo v metabolizmu ogljikovih hidratov, predvsem pri vzdrževanju normalne tolerance na glukozo, sodeluje železo pri prenosu elektronov v dihalni verigi in se pojavlja v številnih redoks ter drugih reakcijah (Fujs in sod., 2007).

Navzočnost večjih količin kroma lahko namreč v celici inducira simptome pomanjkanja železa in povzroči oksidativni stresni odziv. Oba elementa spadata med redoks aktivne kovine, ki imajo pomembno vlogo pri tvorbi reaktivnih kisikovih zvrsti v celici, te pa so povzročitelj različnih sprememb na celičnih proteinih, DNA in lipidih (Stearns, 2000).

Železo in krom sta esencialna minerala, ki sta v majhnih količinah potrebna za nemoteno delovanje živih organizmov, v visokih koncentracijah pa sta toksična za celico. Ker sta v hrani in prehranskih dodatkih največkrat navzoča hkrati, smo preučevali tudi vpliv kombinacije različnih koncentracij Fe(III) in Cr(III).

Spremljali smo vpliv Fe(III) in/ali Cr(III) ionov na kvasovko na celični ravni z merjenjem živosti, znotrajcelične oksidacije in na ravni proteinov s preučevanjem proteinskega profila z 2-D elektroforezo. Izbrali smo kontinuirni bioproces, ker je primeren za preučevanje fiziologije celic. Gojenje je kontinuirno takrat, ko bioreaktor obratuje s konstantnim pretokom medija skozi bioreaktor (Berovič, 1992). Volumen je konstanten. Bistvena prednost tega gojenja je, da lahko dosežemo ustaljeno stanje ob pogoju konstantnega volumna in s primerno regulacijo ene izmed koncentracij: biomase, substrata, oziroma pH-ja.

Ta način gojenja ima prednosti pred šaržnim, ker konstantno okolje daje mikroorganizmu boljše pogoje za razvoj, operaterju pa za boljše vodenje in regulacijo (Pavko, 1996).

V prvem delu smo kvasovko izpostavili 2,5 mM Cr(III) ionom. Po 24-urni izpostavljanju je relativna živost znašala 58 % (Preglednica 10, Slika 3). Dodatek 2,5 mM Cr(III) ionov je v celici povzročil 4-krat večjo vsebnost reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v primerjavi s kontrolo (Preglednica 9, Slika 2). V drugem delu poskusa, kjer smo kulturo za 24 ur izpostavili najprej 0,1 mM Fe(III) ionom, je relativna živost znašala 57 % (Preglednica 12, Slika 5). Dodatek 0,1 mM Fe(III) ionov je povzročil 4,7-krat večjo vsebnost ROS v primerjavi s kontrolnim vzorcem (Preglednica 11, Slika 4). Kulturo smo po začetnem izpostavljanju Fe(III) ionom izpostavili še za 24 ur 2,5 mM Cr(III) ionom in opazili, da se je relativna živost znižala na 2,7 %, vsebnost ROS pa dodatno povečala (Preglednica 11 in 12, Slika 4 in 5).

Na podlagi merjenja živosti in znotrajcelične oksidacije nismo opazili značilne razlike v delovanju 2,5 mM Cr(III) in 0,1 mM Fe(III) ionov na celico. Vsekakor pa je bilo moč opaziti, da izpostavitve najprej 0,1 mM Fe(III) ionom in naknadno še 2,5 mM Cr(III) ionom povzroči znatno inhibicijo rasti in še dodaten dvig vsebnosti ROS.

Glede na to, da so spremembe na molekulski ravni med prvimi zaznavnimi odgovori na spremembe v okolju (Bierkens, 2000) smo vpliv Fe(III) in/ali Cr(III) ionov na celico skušali pojasniti tudi na ravni proteinov. Izvedli smo 2-D elektroforezo proteinov celičnega ekstrakta v območju molekulske mase 10 – 220 kDa in pI območju 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev smo primerjali s proteinskimi profili netretiranih vzorcev z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. S slik 7 in 8 je razvidno, da vpliv Cr(III) ionov ni tako intenziven, razporeditev 2-D elektroforetskih lis kaže veliko podobnost z razporeditvijo pri kontroli. Devet lis je navzočih na kontroli, ki jih po tretiranju s Cr(III) ioni ne zaznamo več, pri treh lisah pa smo opazili represijo sinteze glede na kontrolo.

Izpostavitve celic Fe(III) ionom je povzročila večjo spremembo proteinskega profila (Slika 9 in 10). Razporeditev 2-D elektroforetskih lis se je precej razlikovala od razporeditve na kontroli. Pri dvanajstih lisah je bila opazna represija sinteze, pri eni lisi indukcija, deset lis se je pojavilo na novo glede na kontrolo. Po začetni izpostavitvi Fe(III) ionom smo kulturo izpostavili še za 24 ur Cr(III) ionom in opazili še dodatne spremembe proteinskega profila. Razporeditev 2-D elektroforetskih lis se je močno razlikovala od razporeditve na kontroli in vzorcu, tretiranim z Fe(III) ioni.

Od šestnajst lis, ki smo jih zaznali na vzorcu, tretiranem z Fe(III) ioni, smo po tretiranju s Cr(III) ioni pri enajstih lisah opazili nadaljevanje represije sinteze, pri eni je bila opažena indukcija sinteze, ostalih štirih pa nismo več zaznali.

Po tretiranju z Fe(III) ioni smo opazili devet na novo sintetiziranih lis, od katerih smo jih šest opazili tudi po naknadni izpostavitvi Cr(III) ionom, vendar je bila intenziteta lis manjša, ostale tri pa nismo več zaznali (Slika 10 in 11).

Inhibicija rasti kvasovke in spremembe v proteinskem profilu po izpostavitvi kovinskim ionom nakazujejo na stresne pogoje v okolju.

Z vidika proteinskega profila je razvidno, da se stresni odgovor po 24 urah izpostavitve Fe(III) ionom razlikuje od stresnega odgovora po izpostavitvi Cr(III) ionom. Še večjo razliko opazimo pri proteinskem profilu celic tretiranih z Fe(III) ioni in naknadni izpostavitvi Cr(III) ionom.

5.2 SKLEPI

Na podlagi raziskovalnega dela, kjer smo preverjali trditev, da povišana koncentracija kromovih in/ali železovih zvrsti vpliva na spremembo v fiziologiji kvasovke *S. cerevisiae* in tudi izražanju proteinskega profila lahko podamo naslednje sklepe:

- Merjenje živosti in znotrajcelične oksidacije ni pokazalo značilnih razlik v delovanju Fe(III) in Cr(III) ionov na celico.
- Izpostavitve celic najprej Fe(III) ionom in naknadno še Cr(III) ionom je povzročila znatno inhibicijo rasti v primerjavi s posameznimi ioni in še dodaten dvig vsebnosti ROS.
- V primerjavi s Cr(III) ioni se je vpliv Fe(III) ionov kazal v večji spremembi proteinskega profila. Razporeditev 2-D elektroforetskih lis se je precej razlikovala glede na kontrolo. Vidna je bila represija sinteze proteinov in sinteza novih glede na kontrolni vzorec.
- Po začetni izpostavitvi Fe(III) ionov je naknadna izpostavitve Cr(III) ionom povzročila še večjo spremembo proteinskega profila. Opazno je bilo nadaljevanje represije sinteze proteinov in odsotnost novo sintetiziranih proteinov.

6 POVZETEK

Železo in krom sta esencialna minerala, ki sta v majhnih količinah potrebna za nemoteno delovanje živih organizmov, v visokih koncentracijah pa sta toksična za celico. Ker sta v hrani in prehranskih dodatkih največkrat navzoča hkrati, smo preučevali tudi vpliv kombinacije različnih koncentracij Fe(III) in Cr(III). Spremljali smo vpliv Fe(III) in/ali Cr(III) ionov na kvasovko na celični ravni z merjenjem živosti, znotrajcelične oksidacije in na ravni proteinov s preučevanjem proteinskega profila z 2-D elektroforezo. Izbrali smo kontinuirni bioproces, ker je primeren za preučevanje fiziologije celic. V prvem delu smo celice kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) izpostavili Cr(III) ionom. V drugem delu smo postopek ponovili in celice izpostavili najprej Fe(III) ionom, in potem še Cr(III) ionom. Obakrat smo odziv celic spremljali po 24-urni kultivaciji, in sicer na celični ravni z merjenjem živosti in znotrajcelične oksidacije ter na ravni proteoma s preučevanjem proteinskega profila celičnega ekstrakta. Znotrajcelično oksidacijo smo določali z dodatkom fluorescenčnega indikatorja dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetata (H₂DCFDA). Živost celic smo določali s pomočjo komercialnega kompleta, ki vsebuje dve barvili SYTO[®] 9 in propidijev jodid. Komplet omogoča hitro in kvantitativno detekcijo med živimi in mrtvimi kvasnimi celicami. Analizo proteinov celičnega ekstrakta smo izvedli z 2-D elektroforezo, gele smo barvali z barvilom SYPRO RUBY, slikali ter proteinske profile računalniško obdelali s programom 2-D Dymension. Rezultati na ravni proteoma so pokazali razliko v vplivu Cr(III) in Fe(III) ionov na celico, medtem ko z merjenjem živosti in znotrajcelične oksidacije te razlike nismo potrdili. Izpostavitve celic najprej Fe(III) ionom in naknadno še Cr(III) ionom je povzročila znatno inhibicijo rasti v primerjavi s posameznimi ioni ter še dodatno spremembo v vsebnosti ROS in proteinskem profilu. Iz tega lahko sklepamo, da z 2-D elektroforezo dobimo boljši vpogled sprememb celice pod vplivom kovinskih ionov. Proteinski profil nam omogoča jasno sliko dogajanja v celici, medtem ko z določanjem živosti in znotrajcelične oksidacije ne dobimo popolne slike celičnih obrambnih mehanizmov in poškodb znotraj celice. Sprememba proteinskega profila celice je dober indikator sprememb in dobra osnova za nadaljnjo analizo. Z raziskovalno nalogo smo potrdili hipotezo, da povišana koncentracija kromovih in/ali železovih zvrsti povzroči spremembo v fiziologiji in tudi izražanju proteinskega profila.

7 VIRI

Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-89

Berovič M. 1992. Aerobni bioreaktorji. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 203-223

Bierkens J.G.E.A. 2000. Application and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, 153: 61-72

Collinson L.P., Dawes I.W. 1992. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *Journal of General Microbiology*, 38: 329-335

Culotta V.C., Yang M., O'Halloran T.V. 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 747-758

Dröge W. 2002. Free radicals in the control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95

Forsberg L., Faire de U., Morgenstern R. 2001. Oxidative stress, human genetic variation and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389: 84-93

Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112

Fujs Š., Ekert M., Ščančar J., Raspor P. 2007. Induced cross-protection responses against Cr(III) and Fe(III) ions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 301-308

Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 4241-4257

Görg A. 1992. Two-dimensional electrophoresis. *Nature*, 349: 545-546

Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perron M., Boucherie H., Toledano M.B., Labarre J. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 22480-22489

Grant C.M. 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39: 533-541

Halliwell B., Aruomab I.O. 1991. DNA damage by oxygen-derived species - its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. V: Antioxidants in nutrition, health and disease. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 111-135

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936

Haugland R.P. 2002. Nucleic acid detection and genomics technology. V: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 9th ed. Gregory J. (eds). Eugene, Molecular Probes: 265-352

Herrero E., Ros J., Belli G., Cabisco E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 1217-1235

Hershey J.W.B., Merrick W.C. 2000. The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. V: Translation control of gene expression. Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B. (eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 33-88

Hiltunen J.K., Mursula A.M., Rottensteiner H., Wierenga R.K., Kastaniotis A.J., Gurvitz A. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 35-64

Hong M.L.W., Jiang N., Gopinath S., Chew F.T. 2006. Proteomics technology and therapeutics. V: *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. Hong M.L.W. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing, 33: 5, 6: 563-568

Huang X. 2003. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutation Research*, 533: 153-171

Ibrahim E.M., Wogerbauer M., Sigmund H., Burgmann H., Graninger W. 2000. Identification of yeast species by fatty acid profiling as measured by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 742: 13-24

Ikner A., Shiozaki K. 2005. Yeast signalling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research*, 569: 13-27

Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301

Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527

Jamieson D.J. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology*, 174: 6678-6681

Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr (VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17: 316-323

Jamnik P., Raspor P. 2005. Methods for monitoring oxidative stress response in yeast. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19, 4: 195-203

Jamnik P., Medved P., Raspor P. 2006. Increased glutathione content in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to NaCl. *Annals of Microbiology*, 56, 2: 175-178

Jamnik P., Raspor P. 2008. Proteomika v prehrani. V: Proteomika. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-51

Kojda G., Harrison D.G. 1999. Interactions between NO and reactive oxygen species: patophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes, and heart failure. *Cardiovascular Research*, 43: 562-71

Križaj I. 2008. Metoda za analizo proteoma. V: Proteomika. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-32

Kuiper H.A., Kok E.J., Engel K.H. 2003. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 238-243

Lubec G., Krapfenbauer K., Fountoulakis M. 2003. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in Neurobiology*, 69: 193-211

Mattagajasingh S.N., Misra H.P. 1999. Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-proteins crosslinks induced by a carcinogenic chromium (VI) in cultured intact human cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199: 1, 2: 149-162

Manček B., Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farmaceutski vestnik*, 52: 133-144

Mager W.H., Hohmann S. 1997. Stress response mechanisms in the yeast. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 1-5

Medić-Šarić M., Buhač I., Bradamante V. 2002. Minerali. V: Vitamini in minerali. Ptuj, In Obs Medicus, 161-169

Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19: 651–658

Murray J., Oquendo E.C., Willis H.J., Marusich F.M., Capaldi A.R. 2008. Monitoring oxidative and native modification of cellular proteins; a paradigm for identifying key disease related markers of oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 1497-1503

Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defence, damage and death. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 5, 5: 277-285

Nordberg J., Arnér E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*: 31, 11: 1287-1312

O'Brien J.T., Fornsaglio L.J., Ceryak S., Patierno R.S. 2002. Effects of hexavalent chromium on the survival and cell cycle distribution of DNA repair-deficient *S. cerevisiae*. *DNA Repair*, 1, 8: 617-627

O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 4007-4021

Ozawa T., Hanaki A. 1990. Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of the biological reductants: Is Cr(III) nontoxic? *Biochemistry International*, 22: 343-352

Paš M., Piškur B., Šuštarčič M., Raspor P. 2007. Iron enriched yeast biomass - a promising mineral feed supplement. *Bioresource Technology*, 98: 1622-1628

Pavko A. 1996. Masne bilance in načini vodenja bioprosesov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 425-435

Perrone G.G., Tan S.X., Dawes W.I. 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783: 1354-1368

Payne T., Hanfrey C.L., Bishop L.A., Michael J.A., Avery V.S., Archer B.A. 2008. Transcript-specific translational regulation in the unfolded protein response of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 582: 503-509 ‡

Ruebelt M.C., Leimgruber N.K., Lipp M., Reynolds T.L., Nemeth M.A., Astwood J.D., Engel K.H., Janyk D. 2006. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2154-2161

Sarma A.D., Oehrle N.W., Emerich D.W. 2008. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 379: 192-195

Sigler K, Chaloupka J, Brozmanova J, Stadler N, Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms - I - microbial vs. higher cells - damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*.44, 6: 587-624

Stearns M.D. 2000. Is chromium a trace essential metal? *BioFactors*, 11: 149-162

Shi H., Hudson G.L., Liu K.J. 2004. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 5: 582-593

Štalcer B., Ploj T. 1993. Kisikovi prosti radikali-nastanek, reakcije in pomen v organizmu. *Medicinski razgledi*, 32: 403-425

Temple M.D., Perrone G.G., Dawes I.W. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, 15: 319–326

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Petru Rasporju se zahvaljujem za nasvete, pomoč in strokovno vodenje pri sestavljanju diplomskega dela.

Somentorici in delovni mentorici doc. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za pomoč pri vodenju eksperimentalnega dela, za vse koristne nasvete, spodbudne besede in potrpežljivost. Hvala za sleherno minuto svojega dragocenega časa, čudovita mentorica ste.

Recezentu doc. dr. Blažu Cigiću se zahvaljujem za kritičen pregled dela.

Hvala Martini Ekert za vso pomoč pri laboratorijskem delu, za vse nasvete in spodbudne besede pri nastajanju tega dela, ter za vse vikende, ki jih je žrtvovala zame.

Hvala Mileni Žabkar za tehnično pomoč in vse laboratorijske pripomočke, ki nam jih je preskrbela, hvala Mateju Šerganu za vso tehnično pomoč in ves prosti čas, ki ga je žrtvoval zame, hvala dr. Štefanu Fujsu za pomoč v laboratoriju in spodbudne besede »ne sekiraj se, še hujše bo«, hvala vsem drugim sodelavcem iz laboratorija Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in vrednotenje živil za prijaznost in prijetno vzdušje, ki mi je omogočalo uspešnejše delo.

Maja, hvala ti za vso podporo in prijateljstvo v vseh letih študija, za vse telefonske pogovore, s katerimi si me spodbujala pri pisanju naloge.

Hvala Suzani, Anji, Vidi, Borisu in Maji za vsako prijazno besedo in prijateljstvo v času študija.

Irena hvala za vse vzpone na Šmarno goro, vse izlete na Bled in v Kranjsko goro, ki so me razvedrili in mi dajali energijo za delo.

Hvala g. Ernestu Jelerju za vso podporo, prijaznost, naklonjenost, humor, elan in nasvete v vseh letih mojega študija, hvala za lektoriranje tega dela in hvala, ker obstajate. **Luč mojega življenja ste.**

Hvala izr. prof. dr. Milanu Terčelju za neskončno in brezpogojno ljubezen, za podporo in nasmeh na mojemu obrazu, za optimizem in spodbujanje. Hvala ti, ljubi Milan, za sleherno minuto, ki si mi jo posvečal, vsak moj dvom si znal samo ti spremeniti v optimizem. Hvala za finančno podporo, za vse nasvete in še več: ob tvojih treh diplomah imaš sedaj še četrto. Lahko rečem, da brez tvoje pomoči ne bi nikoli diplomirala. Smisel mojega življenja si, bil si mi luč na koncu predora na moji poti do končnega cilja. Hvala ti iz srca.

Hvala Aleksandar, moj ljubljeni sin. Hvala za vsak spodbudni pogled, za vsak nasmeh, ki mi ga podarjaš, za vsak poljubček in objem. Srečna sem, da sem lahko mati tako čudovitem otroku.

Hvala moji mami za vse, kar je naredila, da sem to kar sem.

