

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina PEGAN

**ŠTUDIJ CELIČNE SMRTI PRI KVASOVKI
Saccharomyces cerevisiae PO IZPOSTAVITVI
KADMIJEVIM IN KROMOVIM IONOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina PEGAN

ŠTUDIJ CELIČNE SMRTI PRI KVASOVKI *Saccharomyces cerevisiae* PO IZPOSTAVITVI KADMIJEVIM IN KROMOVIM IONOM

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

THE STUDY OF CELL DEATH OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AFTER EXPOSURE TO CADMIUM AND CHROMIUM IONS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Cellular and applied microbiology (Microbiologia celular aplicada) ustanove Institute for Molecular and Cell Biology (Instituto de Biologia Molecular e Celular) v Portu.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja in za recenzenta prof. dr. Kristijana Jezernika.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzent: prof. dr. Kristijan Jezernik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. Kristijan Jezernik
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Pegan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	579.22/.26: 582.282.23: 546.68: 546.76 (043) = 863
KG	fiziologija mikroorganizmov/kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /stres/oksidativni stres/kadmij/krom/celična smrt/apoptoza/kaspaze
AV	PEGAN, Katarina
SA	RASPOR, Peter (mentor)/JEZERNIK, Kristijan (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	ŠTUDIJ CELIČNE SMRTI PRI KVASOVKI <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PO IZPOSTAVITVI KADMIJEVIM IN KROMOVIM IONOM
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XIII, 44 str., 5 pregl., 7 sl., 5 pril., 135 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Pri kvasovki <i>S. cerevisiae</i> so opazili tipične znake apoptotske celične smrti, med katerimi je tudi delovanje beljakovine Yca1, ki je podobna sesalskim kaspazam. Apoptozo pri kvasovkah izzove izpostavitvev nizkim koncentracijam H ₂ O ₂ in nasploh se zdi, da so glavne regulatorke celotnega procesa reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Tudi kadmij in krom povzročita oksidativni stres pri kvasovkah. V nalogi smo dokazali, da so celice <i>S. cerevisiae</i> občutljive na koncentracije (Cr ₂ O ₇) ²⁻ višje od 4 mM in koncentracije CdCl ₂ ⁻ višje od 10 mM. V kulturi kvasovk, izpostavljeni 4-mM raztopini (Cr ₂ O ₇) ²⁻ oz. 10-mM raztopini CdCl ₂ ⁻ , je bilo približno 50 % živih celic. Namen naloge je bil proučiti, ali kadmijevi oz. kromovi ioni povzročijo apoptozo pri celicah, kvasovk <i>S. cerevisiae</i> . Glede na to, da ROS nismo opazili v celicah izpostavljenih CdCl ₂ ⁻ , smo apoptozi sledili le pri celicah izpostavljenih (Cr ₂ O ₇) ²⁻ . V vzorcu celic kvasovk, izpostavljenih (Cr ₂ O ₇) ²⁻ , nismo opazili encimatskega delovanja kaspaz, medtem ko smo ga pri kontrolnih vzorcih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC 579.22/.26: 582.282.23: 546.68: 546.76 (043) = 863
 CX physiology of microorganisms/yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/stress/oxidative stress/cadmium/chromium/cell death/apoptosis/caspases
 AU PEGAN, Katarina
 AA RASPOR, Peter (supervisor)/JEZERNIK, Kristijan (reviewer)
 PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2007
 TI THE STUDY OF CELL DEATH OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AFTER EXPOSURE TO CADMIUM AND CHROMIUM IONS
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XIII, 44 p., 5 tab., 7 fig., 5 ann., 135 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The yeast *S. cerevisiae* can undergo programmed cell death that exhibits the typical cellular markers of apoptosis including a caspase-like protein Yca1. Apoptosis in yeasts can be induced by low external doses of H₂O₂ and reactive oxygen species (ROS) seem to be central regulators of the whole mechanism. Cadmium and chromium induce oxidative stress in yeasts. We show here that *S. cerevisiae* cells in logarithmic phase are sensitive to concentrations of (Cr₂O₇)²⁻ higher than 4 mM and concentrations of CdCl₂⁻ higher than 10 mM. Treating yeasts with 4 mM (Cr₂O₇)²⁻ or 10 mM CdCl₂⁻ results in approximately 50% cell viability. The aim of the research was to investigate if cadmium or chromium ions caused apoptosis in *S. cerevisiae* yeast cells. Considering that intracellular ROS were observed just in cells treated with (Cr₂O₇)²⁻ and not in those treated with CdCl₂⁻, detection of apoptosis or necrosis was performed only with (Cr₂O₇)²⁻ as stress agent. It appears that (Cr₂O₇)²⁻ treatment does not induce a caspase-like enzymatic activity in yeast comparing to the control samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLENIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJA RAZISKOVALNEGA DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OKSIDATIVNI STRES	2
2.1.1 Kaj je oksidativni stres?.....	2
2.1.2 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	2
2.1.3 Tarče ROS v celici	3
2.1.4 Kako se celice soočajo z ROS in oksidativnimi poškodbami.....	4
2.2 VLOGA KOVINSKIH IONOV PRI OKSIDATIVNEM STRESU	4
2.2.1 Kadmijevi ioni.....	5
2.2.1.1 Prehod v celico	5
2.2.1.2 Oksidativni stres	5
2.2.2 Kromovi ioni	5
2.2.2.1 Prehod v celico	6
2.2.2.2 Oksidativni stres	6
2.3 CELIČNA SMRT	6
2.3.1 Nekroza in programirana celična smrt	6
2.3.2 Apoptoza pri sesalcih	7
2.3.2.1 Kaspaze.....	7
2.3.2.2 Potek in uravnavanje apoptoze	8
2.3.3 Apoptoza pri kvasovkah	10
2.3.4 Metode sledenja apoptoze	13
2.3.5 ROS, kadmijevi ioni, kromovi ioni in celična smrt	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 POTEK DELA.....	18
3.2 METODE	19

3.2.1	Priprava inokuluma	19
3.2.2	Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku	19
3.2.3	Določanje živosti	19
3.2.4	Ocena znotrajcelične oksidacije	19
3.2.4.1	Ocena znotrajcelične oksidacije z metodo pretočne citometrije	20
3.2.4.2	Ocena znotrajcelične oksidacije s fluorescenčno mikroskopijo	20
3.2.5	Določanje aktivnosti kaspaz	20
3.2.5.1	Določanje aktivnosti kaspaz z metodo pretočne citometrije	21
3.2.5.2	Določanje aktivnosti kaspaz s fluorescenčno mikroskopijo	21
3.2.6	Statistična obdelava rezultatov	21
3.3	MATERIALI	22
3.3.1	Mikroorganizem	22
3.3.2	Gojišča	22
3.3.2.1	Trdno gojišče YPD	22
3.3.2.2	Tekoče gojišče YPD	23
3.3.2.3	Tekoče gojišče YPD z dodano raztopino (Cr ₂ O ₇) ²⁻ ali CdCl ₂	23
3.3.3	Reagenti, raztopine	23
3.3.3.1	Ocena znotrajcelične oksidacije	23
3.3.3.2	Določanje aktivnosti kaspaz	23
3.3.4	Pribor in oprema	24
3.3.4.1	Steklovina, potrošni material ter ostala standardna laboratorijska oprema.	24
3.3.4.2	Aparature	24
3.3.4.3	Programska oprema	24
4	REZULTATI.....	25
4.1	DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
4.2	IZBOR KONCENTRACIJ (Cr ₂ O ₇) ²⁻ OZ. CdCl ₂ , PRI KATERIH JE PREŽIVELOST 50 %	26
4.3	OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE.....	27
4.3.1	Ocena znotrajcelične oksidacije z metodo pretočne citometrije	27
4.3.2	Ocena znotrajcelične oksidacije s fluorescenčno mikroskopijo	28
4.4	DOLOČANJE AKTIVNOSTI KASPAZ.....	29
4.4.1	Določanje aktivnosti kaspaz z metodo pretočne citometrije	29
4.4.2	Določanje aktivnosti kaspaz s fluorescenčno mikroskopijo	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	30
5.1	RAZPRAVA.....	30

5.1.1	Rastna krivulja kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
5.1.2	Izbor koncentracij $(Cr_2O_7)^{2-}$ oz. $CdCl_2$, pri katerih je preživelost kvasovk 50 %	30
5.1.3	Ocena znotrajcelične oksidacije	30
5.1.4	Določanje aktivnosti kaspaz	31
5.2	SKLEPI.....	33
6	POVZETEK.....	34
7	VIRI	35
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLENIC

Preglednica 1: Metode sledenja apoptoze	13
Preglednica 2: Opis vzorcev za pretočno citometrijo	20
Preglednica 3: Opis vzorcev za določanje aktivnosti kaspaz	21
Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča YPD (Burkholder, 1943).....	22
Preglednica 5: Sestava tekočega gojišča YPD (Burkholder, 1943)	23

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poskusa	18
Slika 2: Rastna krivulja za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (T = 26 °C, 120 obr./min)	25
Slika 3: Odstotek živih celic v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah (Cr ₂ O ₇) ²⁻ po 30 minutah	26
Slika 4: Odstotek živih celic v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah CdCl ₂ po 30 minutah	26
Slika 5: Ocena znotrajcelične oksidacije z metodo pretočne citometrije: odstotek fluorescentnih celic v vsakem vzorcu kulture kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 30-min inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)	27
Slika 6: Ocena znotrajcelične oksidacije s fluorescenčno mikroskopijo: celice kulture kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 30-min inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)	28
Slika 7: Določanje aktivnosti kaspaz s pretočno citometrijo pri kvasovkah <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-h inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)	29

KAZALO PRILOG

- Priloga A: OD₆₀₀ v odvisnosti od časa med kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (26 °C, 120 obr./min)
- Priloga B1: Povprečen odstotek živih celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah (Cr2O7)²⁻ po 30 minutah inkubacije (26 °C, 120 obr./min)
- Priloga B2: Povprečen odstotek živih celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah CdCl₂ po 30 minutah inkubacije (26 °C, 120 obr./min)
- Priloga C: Rezultati pretočne citometrije: odstotek fluorescentnih celic v vsakem vzorcu kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* po 30-min inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)
- Priloga D: Rezultati pretočne citometrije: določanje aktivnosti kaspaz pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* po 2-h inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AO	akridin oranž
AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptosis peptidase activating factor 1
Bak	Bcl-2 homologous antagonist
Bax	Bcl-2 associated protein x
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia 2
Bcl-X _L	B cell lymphoma like x protein
Bid	BH3 interacting domain antagonist
<i>cdc48</i>	cell division cycle 48
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFF	DNA fragmentation factor
dH ₂ O	deionizirana voda
DiOC ₆	3,3'diheksiloksiakarbocijanin iodid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	enzyme-linked immunoasorbent assay
FITC-VAD-FMK	fluorescein isothiocyanate-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone
FRET	fluorescence energy transfer
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
IAP	inhibitor of apoptosis
ISNT	<i>in situ</i> nick translation
JC-1	5,5',6,6'-tetrakloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin iodid
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid)
NAO	10-N noniol-akridin oranž
Nma111p	nuclear mediator of apoptosis
obr./min	obrati na minuto
OD ₆₀₀	optical density ($\lambda = 600$ nm)
Omi/Hrt2	high temperature requirement protein 2
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PI	propidium iodide
ROS	reactive oxygen species
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	standardna deviacija
Smac/DIABLO	second mitochondrial activator of caspases
Stm1	seven transmembrane protein 1
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling
Ubp10	ubiquitin-specific protease 10
VDAC	voltage-dependent anion channel
XAF1	XIAP associated factor 1
Yca1	yeast caspase 1
YPD	yeast peptone dextrose
Ysp1	yeast suicide protein 1
Ysp2	yeast suicide protein 2

YVAD

tirozin-valin-alanin-aspartat

SLOVARČEK

APOPTOZA: oblika programirane celične smrti, ki jo prepoznamo po značilnih morfoloških in biokemičnih spremembah celice.

CELIČNA SMRT: proces propada celice, ki se lahko izrazi kot nekroza ali programirana celična smrt.

KASPAZE: cisteinske proteaze, ki cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartatom.

REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI: molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom.

1 UVOD

Izpostavitev kvasovk koncentracijam različnih stresnih dejavnikov izzove apoptozo. Znano je, da apoptoza pri kvasovkah nastopi kot posledica povečane produkcije reaktivnih kisikovih zvrsti v celici. Produkcijo le teh v celici povečajo tudi kadmijevi in kromovi ioni.

1.1 CILJA RAZISKOVALNEGA DELA

Prvi cilj raziskovalnega dela je bil preveriti, če kadmijevi in kromovi ioni, ki povečajo produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti v celici, izzovejo apoptozo pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*.

Drugi zastavljeni cilj pa je bil preveriti in postaviti metodo sledenja aktivnim apoptotskim kaspazam pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kadmijevim in kromovim ionom.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Izpostavitev celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* povišanim koncentracijam kadmijevih in kromovih ionov izzove apoptozo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI STRES

2.1.1 Kaj je oksidativni stres?

Oksidativni stres je definiran kot porušenje ravnotežja med tvorbo ROS (reaktivnih kisikovih zvrsti) in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov v celici (Betteridge, 2000). Neravnotežje je lahko posledica izpostavljenosti celic okoljskemu stresnemu faktorju (prisotnost oksidantov, temperaturni šok, kovinski ioni ...), aktivacije celičnih sistemov nastanka ROS ter porušenega delovanja antioksidativne obrambe zaradi mutacij v obrambo vključenih encimov in/ali pomanjkanja antioksidantov v celici (Costa in Moradas-Ferreira, 1996).

2.1.2 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Pojem reaktivne kisikove zvrsti (ROS) zajema molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, klorom, dušikom (Sigler in sod., 1999). Reaktivne zvrsti so snovi, ki nastajajo med običajnimi procesi v celici (mitohondrijska dihalna veriga, nekatere reakcije katalizirane z oksidazami, razgradnja maščobnih kislin v peroksisomih) (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

V organizmu prosti radikali nastajajo pri redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektrona. Taka reakcija je redukcija kisika do vode pri aerobnem metabolizmu (enačba 1). Ko kisik ne sprejme vseh štirih elektronov (»bežanje« elektronov iz dihalne verige), se tvorijo kisikovi radikali – primarne ROS. Med primarne ROS ne štejemo le kisikovih radikalov, kot so superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), temveč tudi vodikov peroksid (H_2O_2) in singletni kisik (1O_2) (Ames in sod., 1993; Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000; Fariss in sod., 2005).



Primarne ROS v celici reagirajo z večino makromolekul v svoji bližini, kar vključuje beljakovine, lipide, sladkorje in ribonukleinske kisline. Novo nastale molekule lahko predstavljajo strukturno ali funkcionalno neustrezne spojine. Tako nastale spojine imenujemo sekundarne reaktivne kisikove zvrsti (sekundarne ROS) (Kreft in Pečar, 1998; Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000). Kopičenje oksidiranih molekul povzroči staranje celice in sproži programirano celično smrt – apoptozo (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Singletni kisik (1O_2) nastaja v nekaterih kemičnih reakcijah pri počasni reakciji glutationa s superoksidnim radikalom, pri širjenju lipidne peroksidacije in fotokemično iz (običajnega) tripletnega kisika (3O_2) (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000). Reagira z mnogimi organskimi molekulami ob nastanku peroksidov in drugih oksidiranih produktov, vendar je dokaj selektiven in reagira predvsem z nenasičenimi molekulami (nenasičene

maščobne kisline, gvanin v DNK, klorofil) (Sigler in sod., 1999). Molekula singletnega kisika zlahka potuje po celici, saj je velika kot običajna molekula kisika in je lipofilna (Manček in Pečar, 2001).

Superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$) nastane pri prvi stopnji redukcije kisika v dihalni verigi v mitohondrijih, avtooksidaciji znotrajceličnih spojin (kateholi, kinoli ...) in pri različnih transportnih sistemih (Manček in Pečar, 2001). Reagira z encimi s Fe-S centri, kar povzroči inaktivacijo encimov in povečano koncentracijo prostega železa v celici. Povečana koncentracija železa povzroči še dodatne biokemične poškodbe, ker železo sodeluje v Fentonovi (enačba 2) in v Haber-Weissovi (enačba 3) reakciji. Superoksidni anion je nabita molekula, kar otežuje njeno gibljivost prek membran (ne povzroči peroksidacije lipidov) (Santoro in Thiele, 1997; Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000).

Večina vodikovega peroksida (H_2O_2) nastaja pri reakciji dismutacije (Fridovich, 1995). Gre za majhno, nevtralno, stabilno molekulo (ni radikal), ki kot voda difundira po celici ter skozi membrane. Je boljši oksidant kot superoksidni anion. Inaktivira encime, ki imajo v aktivnem centru sulfhidrilne (-SH) skupine (Sigler in sod., 1999). Ob srečanju s kovinskimi ioni prehodnih elementov (Fe, Cu, Cr, ...) v Fentonovi reakciji (enačba 2) razpade na hidroksilni radikal in hidroksilni anion (Santoro in Thiele, 1997).

Hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) v biološkem sistemu nastaja z reakcijami Fentonovega tipa (enačba 2) pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka, ozona in v reakcijah superoksidnega radikala in ionov Fe^{2+} s hipokloro kislino (Manček in Pečar, 2001). Je najbolj reaktiven med ROS in reagira s skoraj vsako celično sestavino (sladkorji, aminokisline, polinenasičene maščobe v membranah, DNK ...) (Sigler in sod., 1999).

2.1.3 Tarče ROS v celici

ROS v celici poškodujejo beljakovine, deoksiribonukleinske kisline in lipide.

Celične beljakovine lahko neposredno oksidirajo vse ROS (Halliwell in Gutteridge, 2000). V večini primerov gre za nepopravljive poškodbe beljakovin, ki so odstranjene s proteolizo (proteasom, vakuolne proteaze) (Fu in sod., 1998; Godon in sod., 1998; Lee in sod., 1999). Hujše težave predstavljajo zelo močno oksidativno poškodovane beljakovine, ki tvorijo skupke zaradi nastanka navzkrižnih kovalentnih vezi ali povečane površinske hidrofobnosti. Ti skupki se ne morejo razgraditi in se kopičijo v celici (Dean in sod., 1997; Fu in sod., 1998).

Jedrne kisline zaradi oksidativnega stresa utrpijo poškodbe, kot so enojni lomi, navzkrižne povezave DNK-beljakovina in poškodbe baz ter sladkorjev (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Najbolj genotoksičen je hidroksilni radikal (enačba 2, enačba 3) (Frankenberg in sod., 1993; Šput, 2001). Sanacija poškodbe je odvisna od popravljalnih mehanizmov. Ti postanejo manj učinkoviti s stopnjevanjem oksidativnega stresa in s staranjem celice (Manček in Pečar, 2001).

Lipidna peroksidacija je sosledje radikalskih in oksidativnih sprememb polinenasičenih maščobnih kislin, ki privedejo do razpada membranske strukture in spremembe njene funkcije (Sigler in sod., 1999). Med peroksidacijo nastali sekundarni radikali ter končni produkti te reakcije poškodujejo DNK in beljakovine (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000).

2.1.4 Kako se celice soočajo z ROS in oksidativnimi poškodbami

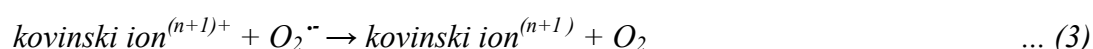
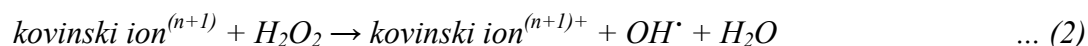
Biokemični procesi, v katerih nastajajo nevarne ROS, so v celicah običajni, zato so se v teku evolucije razvili antioksidativni obrambni sistemi (Manček in Pečar, 2001). Delimo jih na primarne in sekundarne. Primarni odstranjujejo ali sodelujejo pri odstranjevanju ROS, sekundarni pa vključujejo sisteme za popraviljanje ali odstranjevanje poškodovanih molekul. Primarne delimo na encimske (katalaza, superoksid dismutaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza, citokrom c oksidaza, ...) in neencimske (glutathion, metalotionini, tioredoksin, ...). Sekundarni antioksidativni sistemi prevzamejo vlogo, ko primarni niso več dovolj učinkoviti. Med sekundarne obrambne sisteme štejemo lipolitične encime, proteolitične sisteme in popraviljalni sistem DNK. Pomembnejša komponenta sekundarne obrambe je glutathion, ki reducira disulfidne mostičke v beljakovinah (Davies, 1986).

2.2 VLOGA KOVINSKIH IONOV PRI OKSIDATIVNEM STRESU

Med elementi, ki so nujno potrebni za normalno delovanje celice, so tudi kovine oz. kovinski ioni. Za celico je zelo pomembno uravnavanje vsebnosti esencialnih kovinskih ionov (Zn, Fe, Cu), ker so lahko v presežku citotoksični (Klein in sod., 1998). Sooča pa se tudi z drugimi kovinskimi ioni (Ni, Cr, Cd, Pb, As, Ag, Au, Hg), ki se nahajajo v njeni okolici kot posledica onesnaženja. Ni in Cr v celicah najdemo le v sledovih, medtem ko za ostale smatramo, da v celici nimajo biološke funkcije (Thiele, 1992; Klein in sod., 1998).

Kovinski ioni, predvsem pa ioni prehodnih kovin (Cu, Fe, Cr), sodelujejo pri nastanku ROS ali interagirajo z ROS, ki so nastali v drugih celičnih procesih. To povzroči oksidativni stres (Klein in sod., 1998).

Pri tvorbi ROS so pomembne redoks aktivne kovine, ki sodelujejo v Fenton reakciji (enačba 2) in Haber-Weiss reakciji (enačba 3). Vodikov peroksid v Fenton reakciji reagira z reducirano obliko redoks kovine. Pri tem nastane hidroksilni radikal. V Haber-Weiss reakciji oksidirana oblika redoks kovine iz Fenton reakcije reagira s superoksidnim anionom, tako nastane reducirana oblika, ki lahko ponovno povzroči nastanek hidroksilnega radikala (Mager in Hohmann, 1997; Santoro in Thiele, 1997).



2.2.1 Kadmijevi ioni

Kadmij je kemični element s simbolom Cd, ki se nahaja v II. skupini periodnega sistema elementov. Ne spada med prehodne kovine. Oksidacijsko stanje kadmija je Cd(II) (kation), le v redkih primerih je Cd(I) (Lazarini in Brenčič, 1989).

Pomembnejše kadmijeve spojine so kadmijev(II) sulfid (CdS), kadmijev(II) sulfat(VI) (SO₄) kadmijev(II) oksid (CdO) in kadmijev klorid (CdCl₂). Strupenost kadmijevih spojin je odvisna od fizikalno kemičnih lastnosti, v splošnem so v vodi bolj topne spojine tudi bolj strupene. Vrstni red od najbolj do najmanj topne spojine je: CdCl₂ > CdSO₄ > CdO > CdS (Lazarini in Brenčič, 1989; IARC, 1993; Schröter in sod., 1993).

2.2.1.1 Prehod v celico

Poskusi nakazujejo, da kation Cd(II) prehaja v celico kvasovke prek prenašalcev dvovalentnih kationov (Trevors in sod., 1986). Kadmij najverjetneje vstopa v celico prek prenašalca za cink ZRT1 (zinc transport protein 1), saj oba elementa tvorita podobne spojine s tetraedično in oktaedično koordinacijo. Po vstopu v citoplazmo se kadmij veže v kompleks z glutationom (GS – Cd – SG) in tako vezan preide v celično vakuolo. Prehod kadmija v celico je reguliran s koncentracijo kompleksov GS – Cd – SG v citoplazmi (Lazarini in Brenčič, 1989; Gomes in sod., 2002).

2.2.1.2 Oksidativni stres

Kation Cd(II) ni neposredno vpleten v tvorbo ROS, saj zaradi svojega redoks potenciala ne sodeluje v Fenton reakciji v bioloških sistemih. Številni poskusi dokazujejo, da kadmij preprečuje delovanje antioksidativnega obrambnega sistema in s tem omogoči kopičenje pri metabolizmu nastalih ROS. Oksidativni stres sproži posredno (Stohs in Bagchi, 1995; Brennan in Schiestl, 1996; Wätjen in Beyersmann, 2004).

Poleg tega poveča koncentracijo prostih ionov v celici, ki reagirajo v Fenton reakciji. Cd(II) izrine Fe(II) in Cu(II) iz različnih citosolnih in membranskih beljakovin (npr. feritin) in zavzame njun prostor (Price in Joshi, 1983; Casalino in sod., 1997: cit. po Valko in sod., 2006).

2.2.2 Kromovi ioni

Krom je kemični element s simbolom Cr, ki se nahaja v VI. skupini periodnega sistema elementov. Spada med prehodne kovine. Najpogostejša oksidacijska stanja kroma so Cr(II), Cr(III) in Cr(VI). Najpomembnejše so spojine z oksidacijskim številom Cr(VI), najstabilnejše pa z oksidacijskim številom Cr(III) (Lazarini in Brenčič, 1989).

Cr(VI) je močan oksidant in velja za najbolj strupeno obliko tega elementa. V raztopinah je v obliki sledečih anionov: kromatni(VI) ion (CrO₄)²⁻, dikromatni(VI) ion (Cr₂O₇)²⁻ in hidrogenkromatni(VI) ion (HCrO₄⁻). V vodnih raztopinah je ravnotežje med kromatnim(VI) in dikromatnim(VI) ionom odvisno od pH. V kislem je prisoten predvsem

dikromatni(VI) ion, v bazičnem pa kromatni(VI) ion (Lazarini in Brenčič, 1989; Losi in sod., 1994; Klein in sod., 1998).

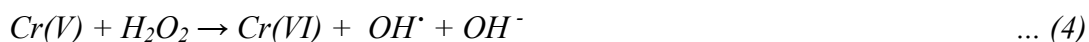
Cr(III) je manj mobilan od Cr(VI) in ga v naravi najdemo vezanega na organske in anorganske snovi. Je manj strupen kot Cr(VI) (Losi in sod., 1994; Klein in sod., 1998).

2.2.2.1 Prehod v celico

V evkariontsko celico prehaja le Cr(VI). Za reducirano obliko Cr(III) je membrana nepropustna (Goodgame in sod., 1982). Proces prehoda zaznamujeta dva dogodka: pospešena difuzija Cr(VI) preko nespecifičnega anionskega prenašalca in znotrajcelična redukcija Cr(VI) v Cr(III). Ker se v celici krom nahaja skoraj v celoti kot Cr(III), se ohranja koncentracijski gradient, ki omogoča prevzem Cr(VI) iz gojišča (Borst-Pauwels, 1981; Arslan in sod., 1987).

2.2.2.2 Oksidativni stres

Toksičnost kroma v glavnem določa redukcija Cr(VI) v nižja oksidacijska stanja, pri čemer se tvorijo prosti radikali (Cervantes in sod., 2001). V procesu redukcije Cr(VI) z znotrajceličnimi reducenti nastanejo Cr(V) kompleksi, ki reagirajo z H₂O₂ v Fenton reakciji (enačba 4). Znotrajcelične redukcije so sposobni tioli, NAD(P)H, FADH₂ ter številne pentoze. Med tioli je najpomembnejši glutation. Pri redukciji Cr(VI) z glutationom nastane tudi glutationilni radikal (Shi in Dalal, 1990a, Shi in Dalal, 1990b; Shi in Dalal, 1990; Shi in sod., 1994).



Končni produkt redukcije Cr(VI) je Cr(III). Cr(III) se veže s fosfatnimi skupinami DNK in povzroči nastanek stabilnih navzkrižnih povezav med molekulami DNK, med DNK in proteini, med DNK in aminokislinami ter nekaterimi drugimi ligandi. Količino navzkrižnih povezav se zmanjša ob prisotnosti antioksidantov (Zhitkovich in sod., 1995; Zhitkovich in sod., 1996; Mattagajasingh and Misra, 1996). V bioloških sistemih je možna tudi redukcija Cr(III) do Cr(II) v prisotnosti L-cisteina ali NADH. Tako kot Cr(VI) tudi Cr(II) reagira v Fenton reakciji (Ozawa in Hanaki, 1990).

2.3 CELIČNA SMRT

2.3.1 Nekroza in programirana celična smrt

Celice lahko propadejo na dva morfološko različna načina (Kerr in sod., 1972).

Nekroza je oblika celične smrti, ki nastopi zaradi hude in nenadne fizične ali kemične poškodbe celice. Najpogosteje gre za poškodbo celične membrane, ki ne omogoča več ohranjanja celične homeostaze. Poteče v nekaj sekundah, v katerih celica in njeni organi nabreknejo, celična membrana počni in vsebina se izlije v okolje. V vretenčarjih povzroči vnetje. Nekrozo si lahko zamislimo kot »umor celice« (Choen, 1993; Collins in sod.,

1997; Willingham, 1999; Lockshin in Zakeri, 2004).

Besedna zveza programirana celična smrt pojmuje edinstven in visoko nadzorovan niz dogodkov v celici, ki pripeljejo do celične smrti. Niz spremlja izražanje celične dednine. Izražanje ne poteka nujno v času propadanja (umiranja): aktivirajo se lahko v celici že prisotne beljakovine. Glede na značilne morfološke in biokemične spremembe v celici, lahko napovemo, katera celica propada. Pridevnik programirana določuje napovedljivost (Willingham, 1999; Lockshin in Zakeri, 2004). Kot programirano celično smrt označujemo procese, kot so apoptoza (Kerr in sod., 1972), paraptoza (Sperandio in sod., 2000) in avtofagocitoza (Schweichel in Merker, 1973: cit. po Lockshin in Zakeri, 2004). Tako smrt si lahko predstavljamo kot »celični samomor« (Willingham, 1999).

2.3.2 Apoptoza pri sesalcih

Apoptozo kot obliko programirane celične smrti je prvi opisal John Kerr (1972). Beseda apoptoza je grškega izvora in pomeni odpadati, v literarnem smislu pa predstavlja odpadanje listja (Kerr in sod., 1972).

Apoptoza je pomemben proces v razvoju zarodka, v imunskem sistemu (npr. selekcija limfocitov B pri humoralnem imunskem odzivu), pri organogenezi in pri nastanku malignih, avtoimunskih ter nevrodegenerativnih obolenj (Lewin, 2004). Gre za fiziološko smrt celice (Štiblar Martinčič, 1998), ki pa ni prisotna samo v večceličnih organizmih. Mnogi geni, ki nadzorujejo apoptozo, so konzervativni in vsesplošni v živih organizmih (Jezernik, 1999). Apoptoza je univerzalen celični pojav in kot tak prisoten tudi pri kvasovkah (Madeo in sod., 1997).

Definicija apoptoze iz leta 1972 sloni na morfoloških spremembah sesalske celice, ki so vidne pod elektronskim mikroskopom. Definirana je kot morfološki fenomen, ki ga prepoznamo po skrčenju celice, po stisnjenih, a nepoškodovanih organelih, po zgostitvi jedrnega kromatina in po oblikovanju citoplazmatskih brstičev ter končno apoptotskih telesc. Apoptotska telesa fagocitirajo sosednje celice (Kerr in sod., 1972). Podobno poteče apoptoza pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* (Madeo in sod., 1997).

Nadaljnje raziskave so razkrile biokemično ozadje apoptoze, ki ga zaznamuje delovanje različnih encimov (Štiblar Martinčič, 1998).

2.3.2.1 Kaspaze

Kaspaze (angl. caspase – cysteine aspartate protease) so cisteinske proteaze, ki cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartatom. Veliko proteaz iz družine kaspaz sodeluje pri apoptozi. Delimo jih v aktivatorske (kaspazi 8 in 9) in efektorske (kaspaza 3). V celicah so prisotne v neaktivni obliki prokaspaz. Za aktivacijo je potrebna proteolitična cepitev. Aktivirani kaspazi 8 in/ali 9 sprožita kaskadno aktivacijo efektorskih kaspaz, posledica česar so morfološke spremembe celice (Lewin, 2004). Danes je aktivacija kaspaz domala sinonim za apoptozo (Lockshin in Zakeri, 2004).

Kaspaze so zelo selektivne proteaze. Prepoznajo relativno kratko zaporedje štirih aminokislin, pri čemer je na C-terminalnem delu zaporedja vedno aspartat. Apoptotske kaspaze na svojem substratu prepoznajo tetrapeptid YVAD (tirozin-valin-alanin-aspartat) (Lewin, 2004).

2.3.2.2 Potek in uravnavanje apoptoze

Apoptozo v sesalski celici lahko sprožijo različni zunajcelični (ekstrinzični) ali znotrajcelični (intrinzični) signali (Lockshin in Zakeri, 2004).

Ekstrinzična signalna pot se sproži preko t.i. receptorjev smrti (Fas in TNF-R1). Apoptoza se sproži ob pomanjkanju preživetvenih dejavnikov (hranila, rastni faktorji, ustrežna temperatura, ...) v okolju ali zaradi prisotnosti specifičnih dejavnikov smrti (ligandi Fas in dejavniki tumorske nekroze, TNF α) (Jezernik, 1999; Lewin, 2004).

Celični mitohondriji so ključni elementi intrinzične signalne poti sprožanja apoptoze. Smrt izzove poškodba celice (npr. zaradi sevanja). Prepustnost mitohondrijskih membran se spremeni, citokrom c se sprost v citosol, kar vodi v aktivacijo prokaspaze 9 (Štiblar Martinčič, 1998; Lewin, 2004).

Kaspaza 8 je ključna kaspaza, ki se aktivira po ekstrinzični poti. Aktivirana cepi beljakovino Bid (BH3 interacting domain antagonist) v citoplazmi. Beljakovini Bak (Bcl-2 homologous antagonist) in Bax (Bcl-2 associated protein x) tvorita poro v zunanji mitohondrijski membrani, skozi katero se sprošča citokrom c. Sproščanje pospešuje C-terminalni del cepljene beljakovine Bid. Na ta način je ekstrinzična pot aktivacije apoptoze povezana z intrinzično (Lewin, 2004).

Beljakovine Bid, Bak in Bax pripadajo družini Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2). V njihovem sekvenčnem zaporedju so odkrili 4 konzervativne regije (BH1, BH2, BH3 in BH4). Družina združuje tako zaviralke kot pospeševalke apoptoze. Delimo jih na 3 razrede: beljakovine zaviralke, ki imajo ohranjene vse štiri domene BH (npr. Bcl-2 in Bcl-X_L (B cell lymphoma like x protein)), beljakovine pospeševalke, ki vsebujejo 3 domene BH1 – BH3 (npr. Bak in Bax) in beljakovine pospeševalke Bcl-2 z eno domeno BH, ki so homologni ostalim predstavnikom le v domeni BH3 (npr. Bid) (Lewin, 2004).

Citokrom c se v citosolu veže z beljakovinami Apaf-1 (apoptosis peptidase activating factor 1) in jim s tem spremeni konformacijo tako, da se izpostavi vezavno mesto za prokaspazo 9, ki se aktivira. Nastane kompleks, ki ga imenujemo apoptosom (citokrom c, Apaf-1 in kaspaza 9). Iz mitohondrija se poleg citokroma c sprostijo tudi druge molekule kot so endonukleaza G, AIF (apoptosis-inducing factor) in Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases). Slednja v apoptosomu zmanjša potrebo po energiji v obliki ATP (Lewin, 2004). AIF deluje v jedru celice, kjer kondenzira kromatin (Susin in sod., 1999).

Potem ko je prišlo do aktivacije aktivatorskih kaspaz 8 in/ali 9, so ustvarjeni pogoji za kaskadno aktivacijo efektorskih kaspaz, ki so odgovorne za značilne morfološke

spremembe apoptotske celice. Kaspaza 9 cepi prokaspazo 3. Kaspaza 3 je osrednja efektorska kaspaza. Učinkuje na dva načina. Neposredno cepi tarčne beljakovine, ki so odgovorne za morfološke spremembe in posredno aktivira druge kaspaze. Substrati efektorskih kaspaz so beljakovine, ki sodelujejo v celičnem signaliziranju, beljakovine citoskeleta, jedrnega matriksa, zaviralci endonukleaz in drugi. Najbolj raziskani tarčni beljakovini kaspaze 3 sta encim PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) in DFF (DNA fragmentation factor). Cepitev encima PARP, ki v celici sodeluje pri obnovi molekule DNK, izkoriščamo pri eni od metod sledenja apoptoze. Cepitev DFF aktivira nukleazo, ki razgradi DNK. Pri razgradnji sodeluje tudi endonukleaza G, ki se je sprostila iz mitohondrija (Kayalar in sod., 1996; Davis in sod., 1998; Lewin, 2004). Nukleaze cepijo jedrno DNK v predelu vrzeli med nukleosomi. Pri tem nastanejo številni oligonukleosomi in mononukleosomi fragmenti, ki se z agarozno gelsko elektroforezo ločijo tako, da tvorijo vzorec lestve. Tudi to značilnost izkoriščamo pri eni od metod sledenja celični smrti. Fragmentacija DNK je pod mikroskopom vidna kot kondenzacija kromatina (Arends in sod., 1990; Willingham, 1999). Pri morfoloških spremembah jedra sodelujejo tudi lamini, jedrne beljakovine, ki se nahajajo ob jedrni ovojnici. Njihova cepitev je potrebna za skrčenje in fragmentacijo jedra (Lazebnik in sod., 1993).

Transglutaminaze navzkrižno povežejo citoplazemske beljakovine in celica se skrči (Fesus in sod., 1987). Celična membrana izgubi fosfolipidno asimetrijo. Fosfatidilserin se izpostavi na zunajcelični strani lipidnega dvosloja, kar nekoliko spremeni prepustnost membrane. Celična membrana kjub temu ostane nepoškodovana (Fadok in sod., 1992).

Efektorske kaspaze cepijo številne beljakovine, ki gradijo citoskelet (npr. aktin) ali sodelujejo pri njegovi ureditvi (npr. gelsolin) (Kayalar in sod., 1996; Kathakota in sod., 1997). Celično ogrodje določuje obliko, notranjo organizacijo in gibanje celice (Cooper in Hausman, 2004). Sprememba v organiziranosti mikrofilamentov vpliva na potek apoptoze. Ista sprememba v nekaterih sesalskih celicah smrt pospeši, v drugih pa zavre. Poleg tega je vse bolj očitno, da spremembe aktinskih filamentov uravnavajo oksidativni stres, ki je posledica apoptotskih sprememb mitohondrija (Kim in sod., 2003; Boldogh in Pon, 2006). Gelsolin je pomožna beljakovina, ki se veže na aktin ter vpliva na specifične strukturne in funkcionalne značilnosti aktinskih filamentov. Jih stabilizira. Človeški gelsolin, hGsn (human gelsolin), je zaviralec apoptoze. Deluje tako, da prepreči spremembo prepustnosti zunanje mitohondrijske membrane prek interakcije z VDAC (voltage-dependent anion channel). VDAC je mitohondrijski porin, na katerega vplivata tudi pospeševalki Bax in Bak. Skozenj se sprosti citokrom c. Na ta način aktin uravnava tudi aktivacijo kaspaze 3 (Narita in sod., 1998; Kusano in sod., 2000; Cooper in Hausman, 2004).

Lizosomi vsebujejo prebavne encime in sodelujejo pri celični prebavi. V njih se prebavijo celične strukture, ki so poškodovane ali jih celica ne potrebuje več (Cooper in Hausman, 2004). Med slednjimi so tudi beljakovine, ki imajo v svoji strukturi Fe (ferritin, mitohondrijski metaloproteini, ...). Lizosomi vsebujejo veliko prostih kovinskih ionov, ki vstopajo v Fentonovo reakcijo z H_2O_2 . OH^\bullet poškoduje membrano lizosoma, in vsebina lizosoma se izlije v citosol, kar sproži apoptozo (Brunk in sod., 2001 cit. po Kurz in sod., 2007; Kurz in sod., 2007). Z membrano lizosoma interagira tudi Bax (Feldstein in sod., 2006 cit. po Kurz in sod., 2007). Encimi lizosoma poškodujejo ostalo vsebino celice med

drugim tudi mitohondrije. Poleg tega lizosomski katepsini cepijo beljakovino Bid. Lizosomska pot apoptoze izzove »puščanje« mitohondrijev. V slednjih se poveča tvorba ROS, kar pospeši proces smrti (Cirman in sod., 2004; Zaho in sod., 2003).

Apoptozo v normalnih fizioloških pogojih postranskripcijsko uravnavajo beljakovine Bcl-2 družine in beljakovine IAP (inhibitor of apoptosis) družine (Zhang in sod., 2005).

Delovanje nekaterih beljakovin iz družine Bcl-2, ki pospešujejo samuničevalni proces apoptoze, je bilo že predstavljeno. Na tem mestu sta predstavljeni v literaturi največkrat opisani beljakovini zaviralki: Bcl-2 in Bcl-X_L. Bcl-2 najdemo zasidrano v zunanji mitohondrijski membrani, v jedrni membrani in v membranah endoplazmatskega retikuluma. Apoptozo zavira tako, da prepreči sprostitve citokroma c in drugih molekul iz mitohondrija. Med zaviranjem sta Bcl-2 in pospeševalka Bid v še naraziskanem medsebojnem odnosu (Lewin, 2004; Zhang in sod., 2005). Bcl-X_L fizično interagira z Apaf-1, s čimer prepreči aktivacijo kaspaze 9 (Hu in sod., 1998). Iz opisanega je razbrati, da beljakovine družine Bcl-2 uravnavajo apoptozo na nivoju mitohondrija. Sposobne so tvorbe različnih homodimerov in heterodimerov. Na primer, apoptozo pospešuje heterodimer Bcl-2/Bax (Lewin, 2004).

Beljakovine družine IAP se vežejo na prokaspaze in aktivirane kaspaze, s čimer jih inaktivirajo (Lewin, 2004). Danes poznamo sedem sesalskih IAP beljakovin. Njihovo delovanje zavirajo vsaj tri beljakovine: Smac/DIABLO, XAF1 (XIAP associated factor 1) in Omi/Hrt2 (high temperature requirement protein 2) (Zhang in sod., 2005).

Proteasom naj bi tudi uravnaval programirano celično smrt. Deluje pa lahko na dva načina. Apoptozo zavira tako, da nepretrgoma razgrajuje beljakovine pospeševalke ali pa pospešuje tako, da razgrajuje beljakovine zaviralke (Drexler, 1998). Huang (2000) in Suzuki (2001) in sodelavci so predložili hipotezo, ki razlaga razgradnjo kaspaz v proteasomu, pri kateri tolmačijo, da kaspaze z ubikvitinom označijo IAP beljakovine (Huang in sod., 2000; Suzuki in sod., 2001; Zhang in sod., 2005).

Apoptoza vključuje mnogo novih beljakovin, zato je razumljivo, da je uravnavana tudi na nivoju transkripcije, prepisovanja. Tumor supresorski gen *p53* kodira beljakovino p53, ki se veže na DNK. Če je dednina poškodovana, p53 ustavi celični cikel in omogoči popravilo napak. V primeru, da napak ni mogoče popraviti, sproži apoptozo. Odgovor p53 na poškodbo DNK ni popolnoma znan. Najbolj verjetni sta dve razlagi. Prva omenja, da omogoči sintezo beljakovin Bcl-2 družine, ki izzovejo poškodbe mitohondrija. p53 je torej posredno vključena pri znotrajceličnem nastajanju ROS. Druga razlaga omenja aktivacijo ali celo *de novo* sintezo receptorjev smrti na površini celice (Jezernik, 1999; Lag in sod., 2002; Lewin, 2004).

2.3.3 Apoptoza pri kvasovkah

Frank Madeo in njegovi sodelavci (1997) so pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* z okvarjenim genom *cdc48* (cell division cycle 48) prvi opazili tipične morfološke in biokemične znake apoptotskega propadanja pri kvasovkah. Fosfatidilserin se izpostavi na

zunANJI strani celične membrane, DNK se fragmentira, kromatin se kondenzira in v končni fazi se pojavijo neke vrste apoptotska telesca (Madeo in sod., 1997; Madeo in sod., 1999). Okvara omenjenega gena onemogoči pravilno delitev celice (Latterich in sod., 1995).

V genomu *S. cerevisiae* ni noben gen homologen apoptotskim genom večceličnih organizmov. Trditev, da je kvasovka sposobna apoptoze, je bila zelo dvomljiva do odkritja beljakovine Yca1 (yeast caspase 1). Gre za beljakovino, ki je strukturno homologna sesalskim kaspazam. Deluje kot aktivatorska kaspaza in se verjetno aktivira v kompleksu z drugimi molekulami (apoptosom kvasovk) (Madeo in sod., 1997; Madeo in sod., 2002). Mitohondrij igra pomembno vlogo tudi pri apoptozi *S. cerevisiae*, saj se iz njega tako kot pri sesalcih sprosti citokrom c (Yamaki in sod., 2001; Ludovico in sod., 2002). Iz sesalskega mitohondrija se sprosti tudi AIF, ki mu je po načinu delovanja podobna beljakovina kvasovk Stm1 (seven transmembrane protein 1). Poizkusi dokazujejo, da se Stm1 razgrajuje v proteasomu. Ko se v kvasovki nakopiči, se sproži apoptoza. Deluje v jedru, kjer interagira z DNK (Ligr in sod., 2001). V poznih fazah sta za izvršitev samouničevalnega procesa potrebni mitohondrijski beljakovini Ysp1 (yeast suicide protein 1) in Ysp2 (yeast suicide protein 2). Ysp1 sodeluje pri morfološki spremembi mitohondrija, vloga Ysp2 pa je zaenkrat še neznan (Pozniakovsky in sod., 2005; Sokolov in sod., 2006).

Encim kvasovke *S. cerevisiae* Ubp10 (ubiquitin-specific protease 10) odstranjuje ubikvitin z jedrne beljakovine, ki uravnava utišanje telomernih genov. Izguba tega encima izzove oksidativni stres in apoptozo (Orlandi in sod., 2004). Enak učinek ima pri kvasovkah prekinitev zapisa beljakovine Cdc13 (cell division cycle 13), ki ščiti telomere ter zagotavlja njihovo podvojevanje. Proteasom in telomere so torej tudi pomembni dejavniki apoptoze kvasovk (Qi in sod., 2003; Orlandi in sod., 2004).

Apoptozo kvasovk sproži nepravilno krajšanje oz. preprečitev krajšanja mRNK (angl. mRNA – messenger ribonucleic acid; sporočilna ribonukleinska kislina). Najbrž jo izzovejo nenavadne beljakovine, ki so rezultat prevajanja nekrajšanih mRNK. V primeru, da so v kvasovki okvarjeni geni, ki poleg tega, da sodelujejo pri krajšanju in snemanju adeninske kape, sodelujejo tudi pri prevajanju, se v celici kopičijo mRNK molekule. Kopičenje mRNK sproži milejšo obliko apoptoze, vendar le-ta ni nujno posledica kopičenja mRNK. Ker v celici ni prevajanja, se tudi beljakovine pospeševalke apoptoze ne sintetizirajo. V vsakem primeru se v celici pojavijo ROS, ki niso posledica okvare mitohondrija (Manzoni in sod., 2003).

Apoptozo kvasovk, neglede na izzivalni dražljaj, v glavnem uravnava ROS (Madeo in sod., 1999). Beljakovina kvasovk Nma111p (nuclear mediator of apoptosis) spada v isto družino beljakovin kot sesalska zaviralka IAP Omi/Hrt2. Nahaja se v jedru, kjer med apoptozo sodeluje pri kondenzaciji in fragmentaciji kromatina. Celično smrt uravnava preko tvorbe ROS. V kvasovkah namreč še ni dokazan obstoj beljakovin podobnih IAP in posledično njihove interakcije z Nma111p (Fahrenkrog in sod., 2003).

Pri uravnavanju tvorbe ROS imajo tako kot pri sesalcih tudi pri kvasovkah pomembno vlogo aktinski filamenti. Interakcije med molekulami aktina so v celici zelo dinamične:

polimerizacija, depolimerizacija, interakcije s pomožnimi beljakovinami, encimi, itd. Stabilizacija aktinskega citoskeleta povzroči depolarizacijo mitohondrijske membrane, povečano tvorbo ROS, več kaspaz v kvasovki in končno smrt. Pri zmanjšanju dinamike ima pomembno vlogo aktin vezavna beljakovina Scp1. Zelo verjetno je, da tudi v kvasovkah aktin uravnava odpiranje in zapiranje mitohondrijskega porina. Aktinski citoskelet bi tako imel ključno vlogo pri uravnavi apoptoze v kvasovkah (Cooper in Hausman, 2004; Gourlay in sod., 2004).

2.3.4 Metode sledenja apoptoze

Preglednica 1: Metode sledenja apoptoze

Metoda	Opis	Vir
Aneksin V test	S FITC označen aneksin V se ob prisotnosti Ca^{2+} ionov veže na fosfatidil serin. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Koopman in sod., 1994
Test z DiOC ₆ (3) (3,3'diheksiloksiakarbocijanin iodid)	V zgodnji fazi apoptoze se zniža mitohondrijski membranski potencial, zato se mitohondriji v celici slabše barvajo z DiOC ₆ (3). Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Vayssiere in sod., 1994
Test z rodaminom 123	V zgodnji fazi apoptoze se zniža mitohondrijski membranski potencial, zato se mitohondriji v celici slabše barvajo z rodaminom 123. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Ferlini in sod., 1996
Test z NAO (10-N noniol-akridin oranž)	Nepoškodovane mitohondrije v zgodnji fazi apoptoze obarva fluorescenčno barvilo NAO, ki se veže na molekule kardiolipina na notranji mitohondrijski membrani. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Petit in sod., 1995
Test z JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin iodid)	V zgodnji fazi apoptoze se zniža mitohondrijski membranski potencial, zato se v mitohondrijih tvori manj JC-1 skupkov. Skupki so obarvani rdeče, monomeri JC-1 pa zeleno. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Petit in sod., 1995
Test s proti – citokrom c protitelesi	V ekstraktu celic citokrom c zasledimo s primarnimi monoklonskimi protitelesi. Na citokrom c vezana protitelesa izmerimo z encimom označenim sekundarnimi protitelesi.	Liu in sod., 1996
Test z DNK barvilom (Hoechst 33342, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), AO (akridin oranž))	Apoptotske celice postopno izgubljajo fragmentirano DNK, zato barvilo manj intenzivno obarva DNK apoptotske celice v primerjavi z neapoptotsko. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Dive in sod., 1992; Willingham, 1999
Test s SYTO 16	Barvilo SYTO 16 obarva jedro apoptotske celice. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Frey, 1995

nadaljevanje Preglednica 1: Metode sledenja apoptoze

Metoda	Opis	Vir
Test z LDS 751	Barvilo Hoechst LDS 751 obarva jedro apoptotske celice. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Frey, 1995
ISNT (<i>in situ</i> nick translation)	Med apoptozo nastale 3'-OH konce fragmentirane DNK izsledimo z označenimi nukleotidi (biotin-dUTP (2'-deoxyuridine 5'-triphosphate), reakcija s peroksidazo), ki jih na fragmente pripenja DNK polimeraza I. Označujemo le lome ene od vijačnic DNK. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Fehsel in sod., 1991
TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)	Med apoptozo nastale 3'-OH konce fragmentirane DNK izsledimo z označenimi nukleotidi (biotin-dUTP, reakcija s peroksidazo), ki jih na fragmente pripenja terminalna deoksinukleotidil transferaza. Označujemo le lome ene od vijačnic DNK. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Gavrieli in sod., 1992
Hairpin, začetni oligonukleotidi	Hairpin oligonukleotidi so označeni z biotinom. Encim ligaza jih prilepi na DNK. Označujemo dvojne lome DNK. Ti so za jedro apoptotske celice dokaj specifični, saj med apoptozo nukleaze cepijo jedro DNK v predelu vrzeli med nukleosomi.	Didenko in sod., 1998
Komet test	Posamične celice vklopimo v agarozni gel. Nato jih liziramo z ustreznim detergentom in izpostavimo električni napetosti. Negativno nabiti fragmenti DNK potujejo po gelu proti anodi.	Olive in sod., 1993
DNK lestvičenje	Izoliramo celično DNK, ki jo po ustrezni pripravi vklopimo v elektroforetski agarozni gel. DNA se v gelu razporedi v značilno obliko lestve. Fragmentacija DNK je za apoptozo značilna.	Arends in sod., 1990
Poliklonska protitelesa za detekcijo fragmentov DNK	Protitelo prepozna lome enojne vijačnice DNK, ki nastanejo med apoptozo.	Naruse in sod., 1994
Monoklonsko protitelo za detekcijo fragmentov DNK	Monoklonsko protitelo (mAb F7-26) prepozna enovijačno DNK celice v zgodnji fazi apoptoze, ko še ni opaziti kondenzacije kromatina. Za detekcijo se uporablja sekundarno protitelo, označeno s fluorescinom.	Frankfurt, 1994

nadaljevanje Preglednica 1: Metode sledenja apoptoze

Metoda	Opis	Vir
Sendvič ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay)	Med apoptozo se DNK fragmentira in nukleosomi se sprostijo v citoplazmo. Z uporabo monoklonskih protiteles sledimo nukleosomom v lizatu citoplazme. Primarno monoklosko protitelo, vezano na ELISA ploščico, prepozna epitop na histonu nukleosoma. Sekundarno protitelo pa prepozna vezan kompleks histonov z DNK.	Salgame in sod., 1997
Razgradnja apoptotske DNK s kislino	DNK apoptotskih in nekrotičnih celic je bolj dovzetna za razgradnjo s kislina. Testirane celice najprej izpostavimo kislini in nato obarvamo z AO. Denaturirano DNK AO obarva metakromatsko. Z barvilom DAPI pa ugotovimo, da se DNK barva manj intenzivno kot DNK vitalne celice. Nepoškodovanost celične membrane dokaže barvanje z barvilom za določevanje živosti.	Hotz in sod., 1992
FRET (fluorescence energy transfer)	Ključni encimi apoptotskih biokemičnih reakcij so kaspaze. Sledimo jim z odkrivanjem produktov, ki nastanejo po cepitvi specifičnih substratov teh encimov. Tak detekcijski sistem je npr. FRET. Substrate pripravimo v laboratoriju.	Xu in sod., 1998
Test z označenim inhibitorjem kaspaz FITC-VAD-FMK (fluorescein isothiocyanate-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone)	FITC-VAD-FMK se ireverzibilno veže na aktivirane kaspaze.	Sytle in sod., 2000
Določanje aktivne kaspaze 3 s poliklonskim protitelesom	Kaspaza 3 se ob aktivaciji cepi na dve podenoti. S poliklonskim protitelesom, ki se veže le na eno podenoto, dokažemo apoptozo.	Srinivasan in sod., 1998
Sledenje substratu kaspaze 3, PARP	Z imunološko indirektno tehniko sledimo produktu PARP, poli (ADP-ribozi).	Davis in sod., 1998
Označevanje lizosomov z AO	Delujoči lizosomi apoptotskih celic se obarvajo z AO rdeče. V lizosomih propadlih celic pa nedelujoča protonska črpalka to onemogoča.	Traganos in Darzynkiewicz, 1994
Opazovanje morfoloških sprememb z elektronskim mikroskopom	Z elektronskim mikroskopom opazimo kondenzacijo jedra in citoplazme. Kasneje se značilno opazi fragmentacijo jedrnega materiala, brste citoplazmatske membrane ter končno stopnjo: nastanek apoptotskih telesc.	Kerr in sod., 1972

Večina testov je zasnovanih na predpostavki, da je neprekinjena, nepoškodovana celična membrana znak za živo celico. Običajno uporabljamo dve fluorescenčni barvili, eno barvilo difundira skozi nepoškodovano celično membrano, drugo pa preide v celice samo skozi kompromitirano membrano (npr. DAPI/propidijev iodid) (Willingham, 1999).

Vse opisane metode niso primerne za vse vrste celice. Med njimi so mnoge specifične za tip in kultivacijo celic in za prikaz apoptoze kvasovk neprimerne (Willingham, 1999). Pri kvasovkah agarozna gelska elektroforeza DNK ne da vzorca lestve, ker je struktura nukleosomov pri kvasovkah drugačna kot pri večceličarjih. Okoli histonov kvasovke se v povprečju navije 164 baznih parov, vrzel med nukleosomi pa sestavlja le 15-20 baznih parov. Pri večceličarjih je na nukleosom navitih povprečno 200 baznih parov, vrzel sestavlja 80 baznih parov. Kvasovke tudi nimajo encima PARP, ki je sicer prisoten v večini evkariontskih celic (Horz in Zachau, 1980; Madeo in sod., 1997; Wang in sod., 1997; Patterton in sod., 1998). Najpogosteje uporabljene metode za prikaz apoptoze pri kvasovkah so: aneksin V test, TUNEL, test z označenim inhibitorjem kaspaz FITC-VAD-FMK, test z rodaminom, test z DNK barvilom in seveda opazovanje morfoloških sprememb z elektronskim mikroskopom (Madeo in sod., 1997; Madeo in sod., 1999; Laun in sod., 2001; Madeo in sod., 2002).

Nabor metod za prikaz celične smrti mora biti dobro premišljen. V populaciji celic je apoptoza neuskaljena. Pri enih se sproži prej kot pri drugih in tudi časovni razpon za izvršitev procesa je od celice do celice različen. Pri nekaterih traja le 30 minut, pri drugih pa celo nekaj dni (Collins in sod., 1997; Štiblar in Martinčič, 1998; Willingham, 1999).

2.3.5 ROS, kadmijevi ioni, kromovi ioni in celična smrt

Harman (1956) je že leta 1956 predvideval, da je staranje kopičenje poškodb celičnih komponent zaradi delovanja prostih radikalov. Danes to hipotezo potrjujejo številni poskusi, ki predstavljajo oksidativni stres kot ključni dejavnik staranja in sledeče celične smrti. Dokazujejo namreč krajšanje življenjske dobe poskusnih organizmov s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti in daljšanje življenjske dobe s povečevanjem učinkovitosti antioksidativnih obrabnih sistemov (Harman, 1956; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

ROS so pomembne pri izvršitvi apoptoze. Ne samo, da povzročajo poškodbe, ki jo izzovejo, pač pa so pomembne tudi kot signalne molekule. To velja tako za celice višjih evkariontov kot za celice kvasovk (Shulz in sod., 1996; Madeo in sod., 1999). ROS ne sodelujejo samo kot poškodovalke DNK, beljakovin in lipidov. Kljub temu, da zunajcelično okolje ne predstavlja oksidativne nevarnosti za celico, se med apoptozo v mitohondriju tvorijo povečane količine ROS. Tvorba ROS je posledica aktivacije kaspaz. Pri kvasovkah pa so ROS nasploh ključne uravnalke apoptoze. V kvasovkah namreč še niso odkrili specifičnih molekul, ki bi imele to vlogo (Shulz in sod., 1996; Shulz in sod., 1997; Madeo in sod., 1997; Madeo in sod., 1999).

Kadmijevi ioni vsaj delno izzovejo apoptozo prek posredne tvorbe ROS (Hassoun in Stohs, 1996; Koizumi in sod., 1996; Hart in sod., 1999; Wätjen in Beyersman, 2004; Murugavel in sod., 2007). Poleg tega lahko izzovejo apoptozo tudi prek motnje homeostaze kalcijevih in cinkovih ionov (Beyersmann in Hechtenberg, 1997). Kadmij poškoduje beljakovine s cinkovimi prsti, ki se vežejo na DNK in tako spremeni izražanje genov (Hanas in Gunn, 1996; Nelson in Cox, 2000). Edini zasledeni vir, ki zanika vlogo ROS v apoptozi, izzvani s kadmijem, predstavlja mehanizem smrti z aktivacijo p53. Po kopičenju p53 se kopiči še

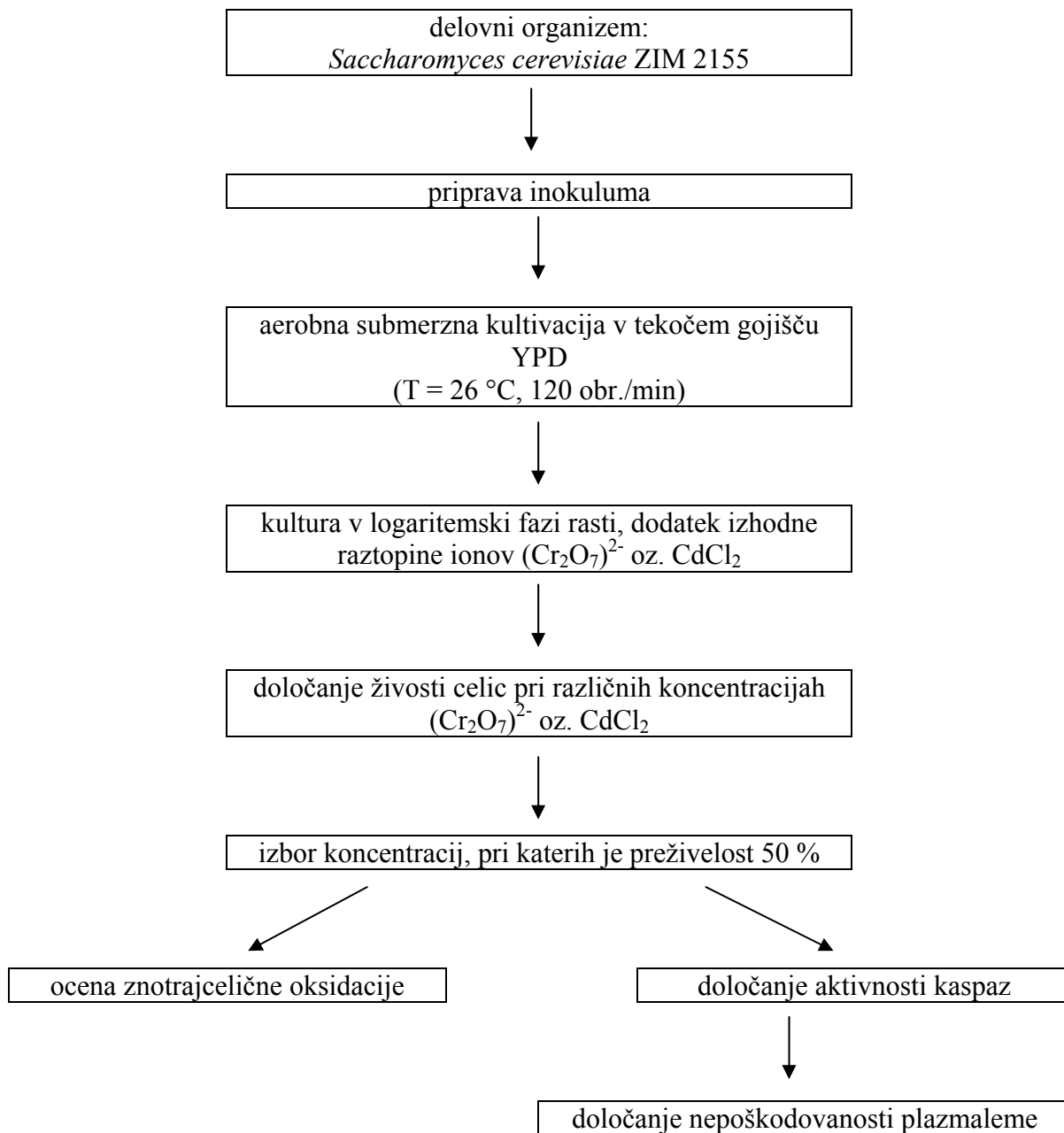
Bax (Lag in sod., 2002).

Krom v glavnem sproži apoptozo, ker se pri znotrajcelični redukciji Cr(VI) v nižja oksidacijska stanja tvorijo prosti radikali. Poleg tega Cr(III) v celici poškoduje makromolekule (DNK, beljakovine, ...). Pri apoptozi, izzvani s kromovimi ioni, se pojavijo značilne spremembe celične morfologije, mitohondrija in aktivirajo se kaspaze (Zhitkovich in sod., 1995; Ye in sod., 1999; Cervantes in sod., 2001; Rudolf in sod., 2005). Številni avtorji poročajo, da lahko apoptoza poteče tudi ob povečanem izražanju p53. Transkripcijski faktor omogoči dodatno nastajanje ROS (Ye in sod., 1999; Pritchard in sod., 2001; Rudolf in sod., 2005).

Ye in sodelavci (1999) poročajo, da s kromom povzročena celična smrt sesalskih celic poteče v dveh stopnjah. V prvi stopnji redukcija Cr(VI) povzroči nastanek ROS. V drugi stopnji se aktivira beljakovina p53. Stopnji sta časovno zamaknjeni (Ye in sod., 1999).

3 MATERIALI IN METODE

3.1. POTEK DELA



Slika 1: Shema poskusa

3.2. METODE

3.2.1 Priprava inokuluma

V 2-l erlenmajericah smo sterilizirali 1 l sveže pripravljene tekočega gojišča YPD (yeast peptone dextrose). Nekaj dni staro kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 smo s cepilno zanko prenesli s petrijeve plošče z gojiščem YPD v 100 ml tekočega gojišča, ki smo ga vlili v 500-ml erlenmajerico.

Aerobna submerzna kultivacija je potekala na rotacijskem stresalniku pri temperaturi 26 °C in 120 obr./min. Rast kvasovk smo spremljali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm vsako uro. Iz rastne krivulje smo določili vrednost optične gostote, ki je ustrezala logaritemski fazi rasti. V tej fazi so bile celice v dobrem fiziološkem stanju. Za inokulacijo smo vedno uporabljali celice, ki so bile v logaritemski fazi rasti.

3.2.2 Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku

Aerobna submerzna kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je potekala na rotacijskem stresalniku pri $T = 26\text{ °C}$ in 120 obr./min. V logaritemski fazi rasti smo kvasovkam dodali izhodno raztopino ionov $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ oz. CdCl_2 .

3.2.3 Določanje živosti

Živost kvasovk v logaritemski fazi rasti v 10 ml-brozgah z različnimi koncentracijami $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ali CdCl_2 po 30 min smo določali z inokulacijo petrijevih plošč s trdnim gojiščem YPD. Brozge so vsebovale 0, 2, 4, 5, 10, 20 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ oz. 0, 5, 10, 15, 30 mM CdCl_2 .

3.2.4 Ocena znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo ocenili z uporabo H_2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). H_2DCFDA prehaja v celico s pasivnim transportom, kjer se deacetilira do H_2DCF s pomočjo nespecifičnih esteraz. Deacetilirano barvilo se zadržuje v celici in se v prisotnosti oksidantov oksidira do fluorescentne oblike (DCF). Nastanek fluorescentne oblike barvila je indikator znotrajcelične oksidacije. Ni znano, katere ROS oksidirajo barvilo, zato dobimo le splošno oceno znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997; Halliwell in Gutteridge, 2000).

2-ml kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v logaritemski fazi rasti, ki so vsebovale 4 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oz. 10 mM CdCl_2 , smo inkubirali 15 min na rotacijskem stresalniku pri $T = 26\text{ °C}$ in 120 obr./min. Po 15 min smo vzorcem dodali 4 μl izhodne 5 mM raztopine diklorofluorescina do koncentracije 10 μM in inkubirali v temi še nadaljnih 15 min pri enakih pogojih. Po inkubaciji smo celice skoncentrirali s centrifugiranjem (30 s; $14,5 \cdot 10^3$ obr./min).

3.2.4.1 Ocena znotrajcelične oksidacije z metodo pretočne citometrije

Za analizo s pretočnim citometrom smo celice resuspendirali v 1 ml PBS.

Vzorci, pripravljene za pretočno citometrijo, so opisani v preglednici 2. Vzorci 1, 2, 3 služijo za določitev fluorescence ozadja.

Preglednica 2: Opis vzorcev za pretočno citometrijo

vzorec	opis vzorca
1	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i>
2	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 10 mM CdCl ₂
3	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻
4	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> z H ₂ DCFDA
5	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> z H ₂ DCFDA
6	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 10 mM CdCl ₂ z H ₂ DCFDA
7	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 10 mM CdCl ₂ z H ₂ DCFDA
8	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻ z H ₂ DCFDA
9	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻ z H ₂ DCFDA

3.2.4.2 Ocena znotrajcelične oksidacije s fluorescenčno mikroskopijo

Za analizo s fluorescenčnim mikroskopom smo celice resuspendirali v 100 μM gojišča YPD.

Vzorci za mikroskopiranje s fluorescenčnim mikroskopom so opisani v preglednici 2, le vzorcev za določitev fluorescence ozadja nismo potrebovali. Pripravili pa smo pozitivno kontrolo, pri kateri smo celice pred barvanjem s H₂DCFDA izpostavili 4 mM H₂O₂.

3.2.5 Določanje aktivnosti kaspaz

Kaspaze so zelo selektivne proteaze. Prepoznajo relativno kratko zaporedje štirih aminokislin, pri čemer je na C-terminalnem delu zaporedja vedno aspartat. Apoptotske kaspaze na svojem substratu prepoznajo tetrapeptid YVAD (tirozin-valin-alanin-aspartat) (Lewin, 2004).

Celice kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 smo inkubirali 2 h ob prisotnosti 4 mM (Cr₂O₇)²⁻, da smo izzvali apoptozo. Hkrati smo inkubirali še divji sev (wt) celic s 3 mM koncentracijo H₂O₂ kot pozitivno kontrolo in divji sev (wt) celic z lovko aktivnih kaspaz, FITC-VAD-FMK (fluorescein isothiocyanate carbobenzox-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone). Inkubacija je potekala na rotacijskem stresalniku pri T = 26 °C in pri 120 obr./min v temi. Po 2 h smo 150 μl kulture skoncentrirali s centrifugiranjem (30 s;

14,5 · 10³ obr./min) in sprali z 1 ml PBS. Celice smo nato resuspendirali v 100 µl FITC-VAD-FMK in inkubirali 20 min. Celice smo ponovno centrifugirali (30 s; 14,5 · 10³ obr./min), sprali z 1 ml PBS in analizirali s pretočno citometrijo in fluorescenčno mikroskopijo. Po dodatku FITC-VAD-FMK je delo potekalo v temi.

Po analizi s pretočno citometrijo oz. fluorescenčno mikroskopijo smo celicam dodali 4 µl PI (propidium iodide). Inkubacija je potekala pri sobni temperaturi 10 min. Nato smo ponovili analizo s pretočno citometrijo oz. fluorescenčno mikroskopijo.

3.2.5.1 Določanje aktivnosti kaspaz z metodo pretočne citometrije

Za analizo s pretočnim citometrom smo celice resuspendirali v 1 ml PBS.

Vzorci pripravljene za pretočno citometrijo so opisani v preglednici 3.

Preglednica 3: Opis vzorcev za določanje aktivnosti kaspaz

vzorec	opis vzorca
1	wt po 2-h izpostavitvi 3 mM H ₂ O ₂
2	celice kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155
3	celice kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155 po 2-h izpostavitvi 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻

3.2.5.2 Določanje aktivnosti kaspaz s fluorescenčno mikroskopijo

Za analizo s fluorescenčnim mikroskopom smo celice resuspendirali v 100 µM gojišča YPD.

Tudi vzorci za fluorescenčno mikroskopijo so opisani v preglednici 3.

3.2.6 Statistična obdelava rezultatov

Pri izbiranju koncentracij K₂Cr₂O₇ oz. CdCl₂, pri katerih je preživeljivost kvasovk 50 %, smo meritve izvedli v dveh paralelnih vzorcih. Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost (\bar{X}) – enačba 5 (Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots (5)$$

n ... število vzorcev

X_i ... vrednost i-te meritve

Za oceno variabilnosti rezultatov pri paralelnih vzorcih smo uporabili standardni odklon

(SD) – enačba 6 (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots (6)$$

3.3 MATERIALI

3.3.1 Mikroorganizem

Uporabljali smo sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete.

Kvasovko smo gojili na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem YPD v inkubatorju pri temperaturi 26 °C in jo vsake tri dni precepljali.

3.3.2 Gojišča

3.3.2.1 Trdno gojišče YPD

Za cepljenje in hranjenje kulture smo uporabili trdno gojišče YPD.

Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča YPD (Burkholder, 1943)

sestavina	masa [g]
kvasni ekstrakt	10
pepton	20
glukoza	20
agar	20
dH ₂ O	do 1000 ml

Sestavine gojišča smo stopili v dH₂O ob segrevanju in mešanju. Agar smo dodali tik pred sterilizacijo, ki je potekala 40 min pri temperaturi 110 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in razlili v petrijevke.

3.3.2.2 Tekoče gojišče YPD

Tekoče gojišče YPD smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase.

Preglednica 5: Sestava tekočega gojišča YPD (Burkholder, 1943)

sestavina	masa [g]
kvasni ekstrakt	10
pepton	20
glukoza	20
dH ₂ O	do 1000 ml

3.3.2.3 Tekoče gojišče YPD z dodano raztopino (Cr₂O₇)²⁻ ali CdCl₂

Tekoče gojišče YPD z dodano raztopino (Cr₂O₇)²⁻ ali CdCl₂ smo uporabili pri poizkusih merjenja znotrajcelične oksidacije in določanju aktivnosti kaspaz.

Raztopino (Cr₂O₇)²⁻ smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,5 g K₂Cr₂O₇ in dodajali dH₂O, dokler se ni popolnoma raztopil. Pripravili smo 0,42 M izhodno raztopino (Cr₂O₇)²⁻. Podobno smo pripravili 0,05 M izhodno raztopino CdCl₂.

Za pripravo gojišč z različnimi koncentracijami (Cr₂O₇)²⁻ oz. CdCl₂ smo odpipetirali ustrezní volumen izhodne raztopine tako, da smo dobili želene končne koncentracije (Cr₂O₇)²⁻ oz. CdCl₂.

3.3.3 Reagenti, raztopine

3.3.3.1 Ocena znotrajcelične oksidacije

- PBS (phosphate-buffered saline) (Gibco)
- dihidro-2,7-diklorofluorescin diacetat (Molecular Probes)
- 100 % etanol (Merck)
- K₂Cr₂O₇ (Sigma)
- CdCl₂ (Sigma)
- dH₂O

3.3.3.2 Določanje aktivnosti kaspaz

- PBS (Gibco)
- CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker (Promega)
- propidijev iodid (Merck)
- 3 mM raztopina H₂O₂ (Merck)
- K₂Cr₂O₇ (Sigma)
- CdCl₂ (Sigma)
- dH₂O

3.3.4 Pribor in oprema

3.3.4.1 Steklovina, potrošni material ter ostala standardna laboratorijska oprema

- erlenmajerice
- petrijeve plošče (Golias)
- 5-ml epruvete za pretočni citometer (Falcon, Becton Dickinson)
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- nastavki za pipete
- 1,5-ml plastične centrifugirke (Eppendorf)
- centrifuga (Eppendorf)
- aluminijasta folija
- stojala za epruvete in centrifugirke
- cepilna zanka
- plinski gorilnik
- magnetno mešalo
- vibro-mix mešalo (VV3, VWR)
- rotacijski stresalnik (Certomat H – Certomat MO11, B. Braun)
- inkubator (B. Braun)
- avtoklav (4472 EP1, Tuttanauer)
- tehtnica (Mettler Toledo)

3.3.4.2 Aparature

- spektrofotometer (UV mini 1240, Shimadzu)
- svetlobni mikroskop (DMLS, Leica)
- fluorescenčni mikroskop (Axioskop, Zeiss)
- pretočni citometer (FAKSORT, Becton Dickinson)
- analitska tehtnica (AG285, Mettler Toledo)

3.3.4.3 Programska oprema

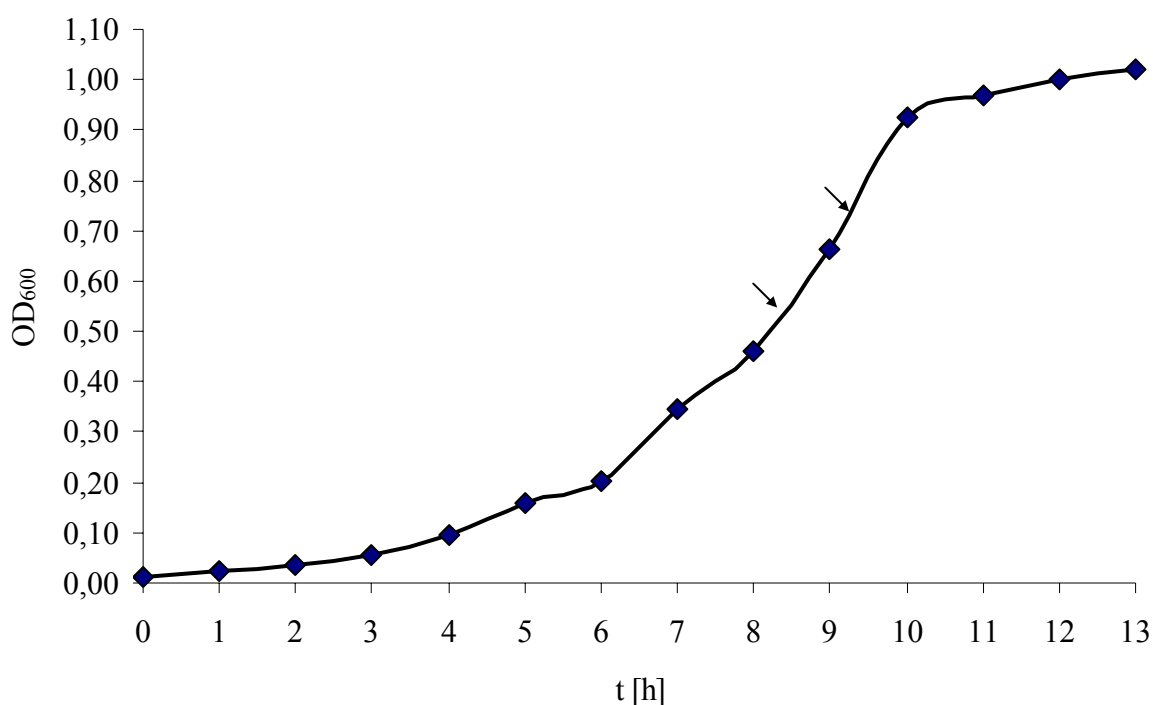
- Microsoft Excell: za analizo podatkov
- Cell Quest (Becton Dickinson): za pridobitev in analizo podatkov, pridobljenih s pretočnim citometrom
- Axiovision 3.0 (Zeiss): za pridobitev podatkov s fluorescenčnim mikroskopom

4 REZULTATI

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v novembru in decembru leta 2005. Obsegal je 200 ur laboratorijskega dela. Slednje je bilo opravljeno v laboratoriju Cellular and applied microbiology (Microbiologia celular aplicada) ustanove Institute for Molecular and Cell Biology (Instituto de Biologia Molecular e Celular) v Portu.

Skušali smo dokazati hipotezo, v kateri trdimo, da povišane koncentracije kadmijevih in kromovih ionov izzovejo apoptozo pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155. Najprej smo spremljali rastno krivuljo in določali živost celic pri različnih koncentracijah $(Cr_2O_7)^{2-}$ oz. $CdCl_2$. Na podlagi dobljenih rezultatov smo določili koncentracijo $(Cr_2O_7)^{2-}$ oz. $CdCl_2$, pri kateri je bila preživelost celic 50 %. Pri teh koncentracijah smo ocenili znotrajcelično oksidacijo. Aktivnost kaspaz smo merili le pri kvasovkah, ki smo jih izpostavili $(Cr_2O_7)^{2-}$.

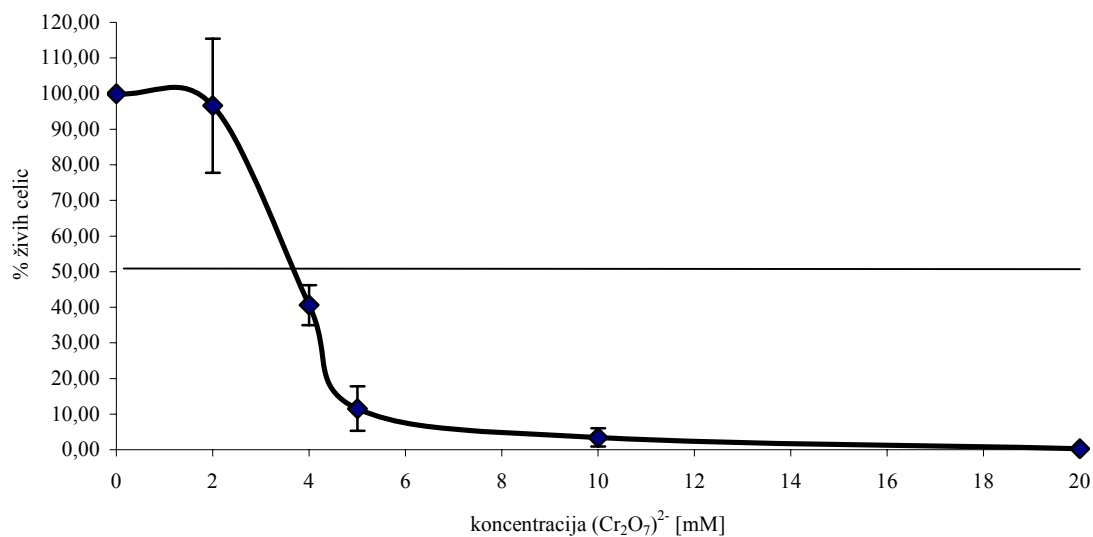
4.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*



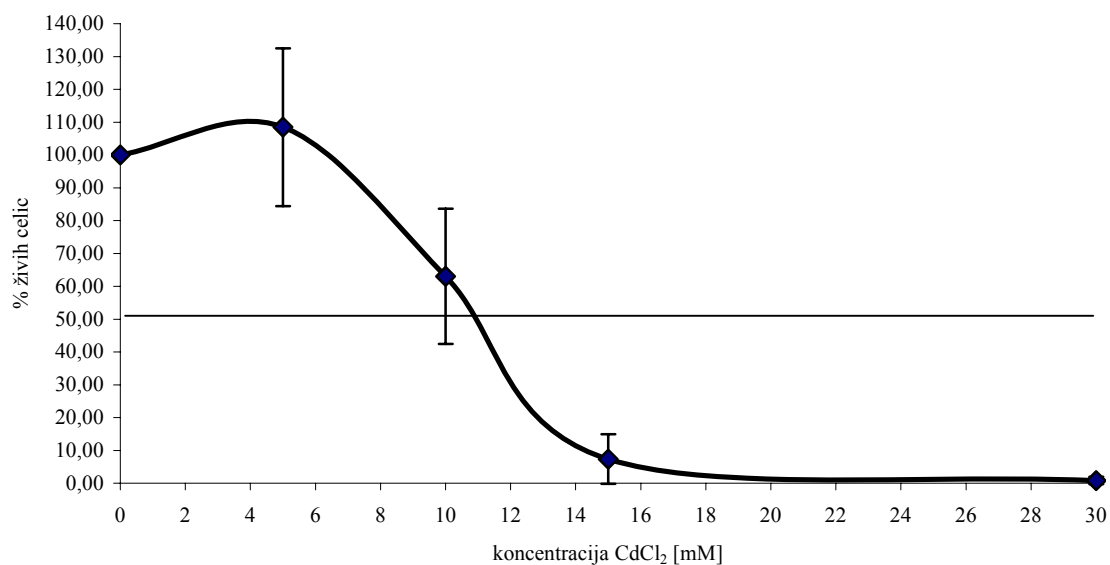
Slika 2: Rastna krivulja za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ($T = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 obr./min) Rezultati so prikazani na podlagi dveh meritev (priloga A).

Iz rastne krivulje smo določili vrednost optične gostote, ki je ustrezala logaritemski fazi rasti: $0,55 < OD_{600} > 0,75$ (puščici). V tej fazi so bile celice v dobrem fiziološkem stanju. Za inokulacijo smo vedno uporabili celice, ki so bile v logaritemski fazi rasti.

4.2 IZBOR KONCENTRACIJ $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ OZ. CdCl_2 , PRI KATERIH JE PREŽIVELOST 50 %



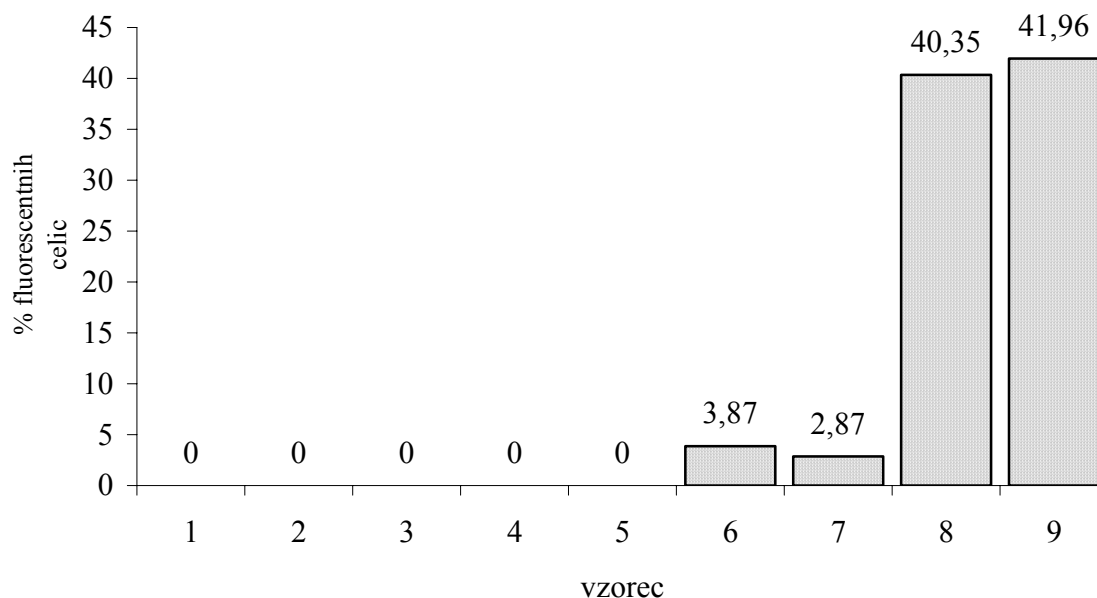
Slika 3: Odstotek živih celic v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ po 30 minutah. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD štirih ponovitev (priloga B1).



Slika 4: Odstotek živih celic v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah CdCl_2 po 30 minutah. Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD štirih ponovitev (priloga B2).

4.3 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE

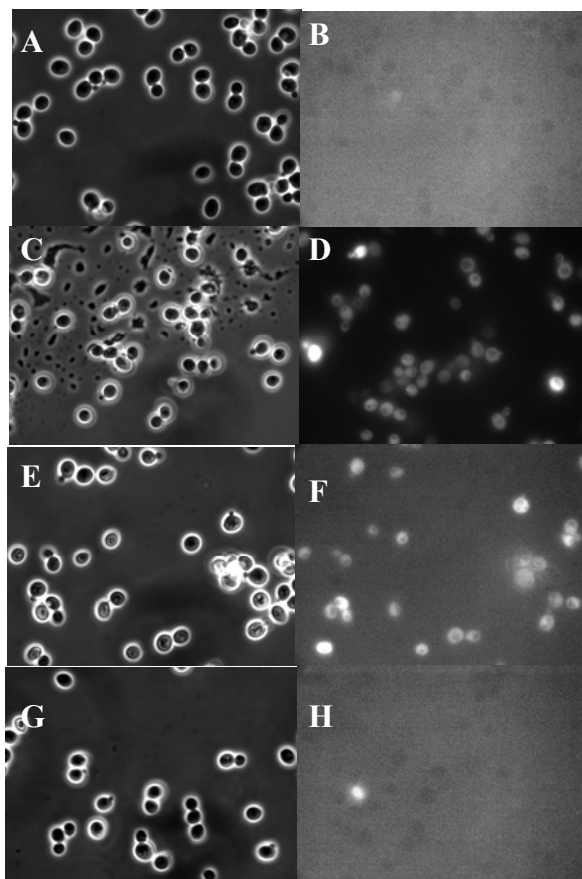
4.3.1 Ocena znotrajcelične oksidacije z metodo pretočne citometrije



Slika 5: Ocena znotrajcelične oksidacije z metodo pretočne citometrije: odstotek fluorescentnih celic v vsakem vzorcu kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* po 30-min inkubaciji ($T = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 120 obr./min) Rezultati so predstavljeni kot odstotek fluorescentnih celic izmed 10000 analiziranih celic (10000 celic predstavlja 100 %) (priloga C).

1 – celice kvasovk *S. cerevisiae*; 2 – celice kvasovk *S. cerevisiae* izpostavljene 10 mM CdCl_2 ; 3 – celice kvasovk *S. cerevisiae* izpostavljene 4 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$; 4, 5 – celice kvasovk *S. cerevisiae* z H_2DCFDA ; 6, 7 – celice kvasovk *S. cerevisiae* izpostavljene 10 mM CdCl_2 z H_2DCFDA ; 8, 9 – celice kvasovk *S. cerevisiae* izpostavljene 4 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ z H_2DCFDA

4.3.2 Ocena znotrajcelične oksidacije s fluorescenčno mikroskopijo

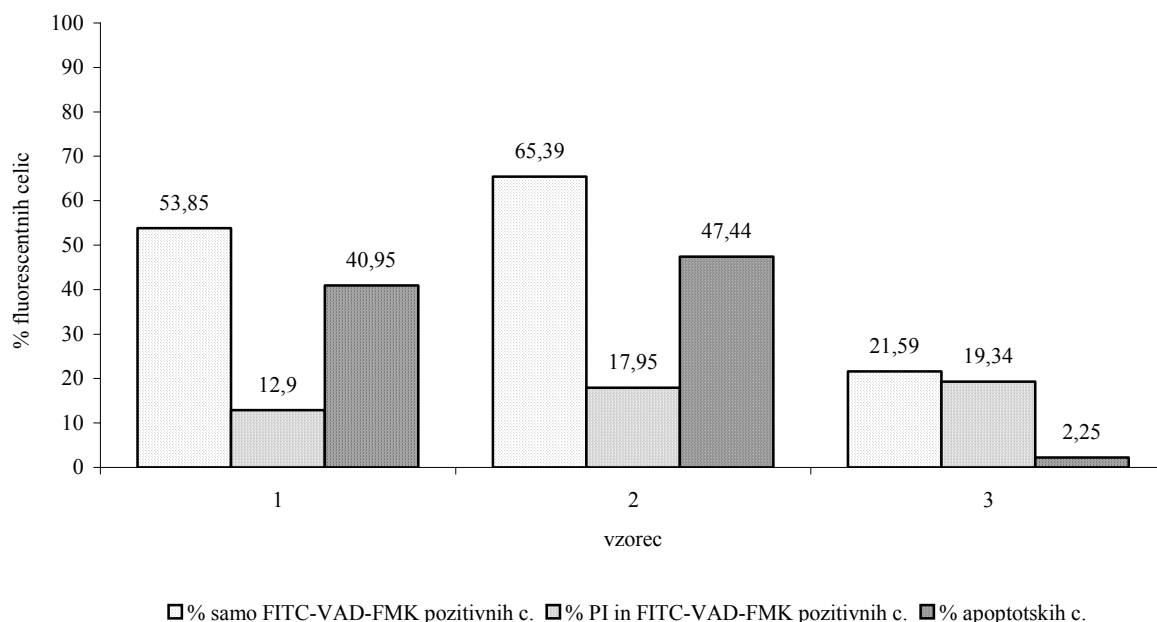


Slika 6: Ocena znotrajcelične oksidacije s fluorescenčno mikroskopijo: celice kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* po 30-min inkubaciji ($T = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 120 obr./min)

A – presevna (transmisijska) slika celic kvasovk *S. cerevisiae*; B – fluorescenca celic kvasovk *S. cerevisiae* slike A; C – presevna (transmisijska) slika celic kvasovk *S. cerevisiae* po 30-min izpostavitvi 4 mM H_2O_2 in barvanju s H_2DCFDA ; D – fluorescenca celic kvasovk *S. cerevisiae* slike C; E – presevna (transmisijska) slika celic kvasovk *S. cerevisiae* po 30-min izpostavitvi 4 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ in barvanju s H_2DCFDA ; F – fluorescenca celic kvasovk *S. cerevisiae* slike E; G – presevna (transmisijska) slika celic kvasovk *S. cerevisiae* po 30-min izpostavitvi 10 mM CdCl_2 in barvanju s H_2DCFDA ; H – fluorescenca celic kvasovk *S. cerevisiae* slike G

4.4 DOLOČANJE AKTIVNOSTI KASPAZ

4.4.1 Določanje aktivnosti kaspaz z metodo pretočne citometrije



Slika 7: Določanje aktivnosti kaspaz s pretočno citometrijo pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* po 2-h inkubaciji ($T = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 120 obr./min)

Rezultati so predstavljeni kot odstotek fluorescentnih celic izmed 10000 analiziranih celic (10000 celic predstavlja 100 %) (priloga D).

1 – divji sev (wt) po 2-h izpostavitvi 3 mM H_2O_2 ; 2 – kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155; 3 – kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 po 2-h izpostavitvi 4 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$;

4.4.2 Določanje aktivnosti kaspaz s fluorescenčno mikroskopijo

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Skladno z delovno hipotezo smo skušali dokazati, da povišane koncentracije kadmijevih in kromovih ionov izzovejo apoptozo v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Rast kvasovke *S. cerevisiae* smo spremljali z merjenjem optične gostote v gojišču YPD (slika 1). Po 7 urah kultivacije so bile celice v logaritemski fazi rasti, po 10 urah se optična gostota ni več povečevala. Iz meritev optične gostote ni mogoče ugotoviti, koliko je bilo živih celic, ker tudi odmrle celice prispevajo k optični gostoti kulture, zato ne vemo ali so po 10 urah celice že odmirale ali so bile v stacionarni fazi rasti.

5.1.2 Izbor koncentracij $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ oz. CdCl_2 , pri katerih je preživelost kvasovk 50 %

Prva splošna informacija, ki smo jo dobili iz rezultatov o preživelosti celic, je bila, da so ioni kadmija in kroma toksični za celico kvasovke. Po 30-min izpostavitvi 5-mM raztopini CdCl_2 je sicer izgledalo, da kadmij ne moti delitev celic. Odstotek živih celic se je povečal za 8,45 %. Pri naslednjih meritvah smo ugotovili, da so višje koncentracije ionov bolj toksične kot nižje. V nasprotju s kadmijevimi ioni so kromovi že pri nizkih koncentracijah toksični. Že po inkubaciji v 2-mM raztopini $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ je bilo za 3,40 % manj živih celic. Odstotek živih celic se je z višanjem koncentracije tako kadmija kot kroma nižal.

Dogovorili smo se, da bomo kvasovke inkubirali z ioni 30 min. Iz rastne krivulje je razvidno, da kultura v logaritemski fazi rasti z OD_{600} med 0,55 in 0,75 v tem času zagotovo še ne preide v stacionarno fazo. Poleg tega smo rezultate meritev dobili že isti dan, tudi če je bilo potrebno poizkus ponavljati ali kulturo ponovno namnožiti zaradi kontaminacij. Seveda bi čas inkubacije z ioni ustrezno podaljšali ali skrajšali, če bi ugotovili, da v 30 min vse celice propadejo oz., da jih pri vsaki izbrani koncentraciji preživi več kot 50 %.

Po končanem poskusu smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo uporabljali 10-mM raztopino CdCl_2 in 4-mM raztopino $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$. Pri teh dveh koncentracijah se je odstotek živih celic najbolj približal številki 50. Natančnejših koncentracij nismo iskali, saj bi si s tem po nepotrebnem zapletli izvajanje ostalih poskusov.

5.1.3 Ocena znotrajcelične oksidacije

Z uporabo barvila diklorofluorescin, ki je sposobno reakcije z oksidanti, in pretočne citometrije smo ugotovili, da 4 mM raztopina $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ po 30 minutah poveča raven oksidantov pri 40 % celic, medtem ko 10 mM raztopina CdCl_2 v istem času poveča raven oksidantov le pri 3 – 4 % celic. Tak rezultat je pričakovan, saj Cd(II) ni redoks aktiven in ne sodeluje v Fenton reakciji v bioloških sistemih. Oksidativni stres povzroča posredno (Stohs in Bagchi, 1995; Brennan in Schiestl, 1996; Wätjen in Beyersmann, 2004). Po drugi

strani pa Cr(VI) sodeluje pri nastanku ROS in interagira z ROS, ki so nastali v drugih celičnih procesih (Klein in sod., 1998). Glede na dosedanje objave poskusov na sesalskih celicah predvidevamo, da bi zasledili povečanje ravni oksidantov pri večjem odstotku kvasovk izpostavljenim kadmijevim ionom, če bi čas inkubacije podaljšali (Wätjen in Beyersmann, 2004).

Slika 5A in slika 5B predstavljata negativno kontrolo. Slikane so celice *S. cerevisiae* v logaritemski fazi rasti, ki niso bile izpostavljene ne $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ ne CdCl_2 . Celice so v dobrem fiziološkem stanju, mnoge brstijo – se razmnožujejo. Držijo se v skupkih, kar je tudi značilno za kulturo v tej fazi rasti.

Celice kvasovk *S. cerevisiae*, barvane z diklorofluoresceinom, smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Za pozitivno kontrolo smo pripravili kulturo kvasovk, ki smo jo inkubirali s H_2O_2 za 30 min (slika 5C in slika 5D). H_2O_2 je reaktivna kisikova zvrst, ki reagira v Fentonovi reakciji z reducirano obliko kovine, pri čemer nastane OH^\bullet (Santoro in Thiele, 1997). Slika 5C ne predstavlja fluorescentnih celic, ampak vse celice v vidnem polju. Na sliki 5D je prikazano isto vidno polje, le da nam nastavitve mikroskopa omogočijo videti le fluorescentne celice: vidimo veliko svetlih celic na temni podlagi. V teh celicah je raven oksidantov povečana. Primerjava obeh slik nam da občutek o deležu celic, v katerih je raven oksidantov povečana. Na podlagi prikazanega in drugih vidnih polj smo ocenili, da gre za približno 80 % vseh celic.

Slika 5E in slika 5F sta fotografiji celic kvasovk *S. cerevisiae* po 30-min izpostavitvi 4 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$. Slika 5G in slika 5H sta fotografiji celic kvasovk *S. cerevisiae* po 30-min izpostavitvi 10 mM CdCl_2 . Ocenili smo, da je približno 60 % fluorescentnih celic po inkubaciji s $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ in približno 4 % fluorescentnih celic po inkubaciji s CdCl_2 . Rezultati fluorescenčne mikroskopije potrjujejo rezultate, dobljene s pretočno citometrijo. Po inkubaciji s $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ se raven oksidantov v celici kvasovk poveča, po inkubaciji s CdCl_2 pa niti ne bistveno. Poleg tega lahko na sliki 5G opazimo več celic z brsti kot na sliki 5E. To pomeni, da je v pogojih izvedbe poskusov kadmij nasploh manj toksičen za celice kot krom. Enak rezultat smo že opazili pri izbiranju ustreznih koncentracij $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ in CdCl_2 . To, da je CdCl_2 sploh toksičen, dokazuje poleg prisotnost celic s povečano ravno oksidantov še primerjava slike 5G s sliko 5A. Na slednji je več celic, več jih brsti.

5.1.4 Določanje aktivnosti kaspaz

Aktivne apoptotske kaspaze smo določali le pri kvasovkah *S. cerevisiae*, ki so bile izpostavljene 4 mM $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$. Tako smo se odločili, ker smo samo v celicah teh kvasovk opazili bistveno povišano raven ROS, ki bi lahko sprožile celično smrt v obliki apoptoze.

Odstotek celic, ki se obarva z lovko aktivnih apoptotskih kaspaz FITC-VAD-FMK, nam pove, v koliko celicah so ti encimi aktivni. Tako barvanje nam ne da informacije o tem, ali imajo celice z aktivnimi kaspazami nepoškodovano celično membrano. Torej ne vemo, ali so še sposobne ohranjanja celične homeostaze, saj barvilo difundira tudi skozi poškodovano membrano. Nastopi lahko tudi nekroza kot posledica hude in nenadne kemične poškodbe celice (Choen, 1993; Collins in sod., 1997; Willingham, 1999). Pri

naslednjem barvanju smo lovko kaspaz uporabljali v kombinaciji s PI. PI lahko vstopi v celice le skozi poškodovano celično membrano. Odstotek apoptotskih celic smo izračunali tako, da smo od celic, ki so bile pozitivno obarvane s FITC-VAD-FMK odšteli celice, ki so bile pozitivno obarvane s FITC-VAD-FMK in PI hkrati.

Rezultati pretočne citometrije (slika 6) nedvomno povedo, da H_2O_2 izzove apoptozo (vzorec 1) ter da se fenomen apoptoze pojavi tudi v stacionarni fazi rasti kvasovk *S. cerevisiae* (vzorec 2). Madeo in njegovi sodelavci so leta 2002 objavili, da H_2O_2 , izzove delovanje kaspaze Yca1 pri kvasovkah (Madeo in sod., 2002). Naši rezultati potrjujejo njihova odkritja. Povedo nam tudi, da 4-mM raztopina $(Cr_2O_7)^{2-}$ v 30 minutah ne izzove aktivacije apoptotskih kaspaz v celicah kvasovk (vzorec 3). V kulturi izpostavljeni $(Cr_2O_7)^{2-}$ so skoraj vse celice, v katerih se da zaslediti kaspaze, nesposobne ohranjanja homeostaze. To pa še ne pomeni, da $(Cr_2O_7)^{2-}$ pri kvasovkah ne izzove apoptoze. Da bi to lahko trdili, bi morali izvesti več poskusov, pri katerih bi analizirali morfologijo celic, biokemične spremembe celične membrane, poškodbe mitohondrija, makromolekul in drugih značilnosti apoptotskih kvasovk, ki so bile že opisane. Mehanizem apoptoze pri kvasovkah še ni tako raziskan kot mehanizem sesalskih celic. Ni nujno, da je aktivacija kaspaz sinonim za apoptozo tudi pri kvasovkah. Možno je, da apoptoza izzvana s $(Cr_2O_7)^{2-}$ ne poteče prek aktivacije Yca1, ampak kako drugače.

S slike 6 lahko preberemo, da je odstotek apoptotskih celic v kulturi *S. cerevisiae* večji (47,44 %) kot pri kulturi teh kvasovk inkubiranih s H_2O_2 (40,95 %). Sklepamo, da je 3-mM H_2O_2 po 2 urah že toksičen za celice in le-te so že propadle – umrle. V kulturi vzorca 2, ki ni bila izpostavljena H_2O_2 je več apoptotskih celic. Poskus se ni izšel po načrtih, saj naj bi vzorec 1 predstavljal pozitivno kontrolo, vzorec 2 pa negativno.

Aktivnost kaspaz smo nameravali opazovati tudi s fluorescenčnim mikroskopom. Poskus ni uspel, ker so bili vzorci ob času mikroskopiranja neuporabni. Pripravljeni so bili ločeno od vzorcev za pretočno citometrijo, a po istem postopku. Ni izključeno, da je prišlo do kakšne osebne napake pri izvajanju protokola. Za pripravo vzorcev smo uporabljali enake materiale, reagente in barvila kot za vzorce, namenjene analizi s pretočno citometrijo. Ker smo vzorce za mikroskopijo pripravili za vzorci za pretočno citometrijo, je možno, da so bila barvila predolgo na neustrezni (sobni) temperaturi.

5.2 SKLEPI

Ioni kadmija in kroma so toksični za celice kvasovk *S. cerevisiae*. V pogojih izvedbe poskusov so kadmijevi ioni manj toksični od kromovih.

Po inkubaciji kvasovk *S. cerevisiae* s $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ se raven oksidantov v celicah poveča glede na kontrolne vzorce. Po inkubaciji s CdCl_2 pa se raven oksidantov v celicah ne poveča bistveno glede na kontrolne vzorce.

Izpostavitev celic kvasovke *S. cerevisiae* povišanim koncentracijam kromovih ionov ne izzove apoptoze prek aktivacije kaspaz, medtem ko smo aktivacijo teh encimov opazili pri kontrolnih vzorcih.

6 POVZETEK

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je idealni evkariontski modelni organizem za proučevanje dogajanj v celicah zaradi enostavne kultivacije, hitre rasti, enostavne priprave in izolacije različnih mutant in dobro poznane fiziologije ter dednega zapisa. Zato so jo začetku 90. let uporabljali kot modelni organizem za heterologno izražanje genov, vpletenih v proces celične smrti in študija njihovih medsebojnih vplivov. Z odkritjem apoptotskega fenotipa kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* leta 1997 so rezultati teh raziskav močno izgubili na pomenu. Odprla pa se je nova možnost uporabe tega organizma v okviru procesa celične smrti. Če bi se izkazalo, da je mehanizem apoptoze v kvasovkah podoben mehanizmu sesalcev, bi se lahko raziskave s sesalskih celičnih kultur prenesle na kulture kvasovk. To bi olajšalo delo v laboratoriju in zmanjšalo stroške poskusov.

V nalogi smo želeli ugotoviti, ali kadmijevi in kromovi ioni sprožajo aktivacijo beljakovin s kaspaznim delovanjem preko tvorbe ROS v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Dokazano je, da jih sprožajo pri sesalskih celicah.

V ta namen smo izbrali ustrezne koncentracije $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ oz. CdCl_2^- , pri katerih po 30 min preživi 50 % celic kvasovk. Pri teh koncentracijah smo z uporabo barvila diklorofluorescina ocenili znotrajcelično oksidacijo v celicah. Ugotovili smo, da samo raztopina $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$ bistveno poveča raven znotrajcelične oksidacije celic. Zato smo le kulturo celic *Saccharomyces cerevisiae*, inkubirano s $(\text{Cr}_2\text{O}_7)^{2-}$, preizkušali na prisotnost kaspaz. V ta namen smo uporabljali lovko aktivnih kaspaz, FITC-VAD-FMK. Kaspaze so zelo selektivne proteaze. Prepoznajo relativno kratko zaporedje štirih aminokislin. Apoptotske kaspaze na svojem substratu prepoznajo tetrapeptid tirozin-valin-aspartat – YVAD. V našem poizkusu aktivnih kaspaz nismo zasledili. Predvidevamo pa, da bi rezultati kombinacije večih testov za sledenje programirani celični smrti pokazali drugačno sliko situacije po izpostavitvi celic kvasovk kadmijevim in kromovim ionom.

7 VIRI

- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 7915-7922
- Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136, 3: 593-608
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2, Suppl. 1: 3-8
- Beyersmann D., Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 2: 247-261
- Boldogh I.R., Pon L.A. 2006. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 450-462
- Borst-Pauwels G.W.F.H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 650: 88-127
- Brennan R.J., Shiestl R.H. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research*, 356: 171-178
- Burkholder P.R. 1943. Vitamin deficiencies in yeasts. *American Journal of Botany*, 30, 3: 206-211
- Casalino E., Sblano C., Landriscina C. 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346, 2: 171-179. Cit. po: Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazu M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40
- Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Guitérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J.C., Moreno-Sánchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 335-347
- Cirman T., Orišić K., Droga Mazovec G., Turk V., Reed J.C., Myers R.M., Salvesen G.S., Turk B. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis, mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 3578-3587
- Cohen J.J. 1993. Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunology Today*, 14, 3: 126-130
- Collins J.A., Schandl C.A., Young K.K., Vesely J., Willingham M.C. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 7: 923-934

- Cooper G.M., Hausman R.E. 2004. The cell. A molecular approach. 3rd ed. Washington, ASM Press: 713 str.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 4, 19: 651-658
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insight into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246
- Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27: 1-20
- Davies K.J.A. 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 2, 3: 155-73
- Davis R.E., Mysore V., Browning J.C., Hsieh J.C., Lu Q.A.T., Katsikid P.D. 1998. *In situ* staining for poly(ADP-ribose) polymerase activity using an NAD analogue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46, 11: 1279-1289
- Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated oxidation. *Biochemical Journal*, 324: 1-18
- Didenko V.V., Tunstead J.R., Hornsby P.J. 1998. Biotin-labeled hairpin oligonucleotides probes to detect double-strand breaks in DNA apoptotic cells. *American Journal of Pathology*, 152, 4: 897-902
- Dive C., Gregory C.D., Phipps D.J., Evans D.L., Milner A.E., Wyllie A.H. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1133: 275-285
- Drexler H.C.A. 1998. Programmed cell death and the proteasome. *Apoptosis*, 3: 1-7
- Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Heson P.M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology*, 147, 7: 2207-2216
- Fahrenkrog B., Sauder U., Aebi U. 2003. The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117: 115-126
- Fariss M.W., Chan C.B., Patel M., Van Houten B., Orrenius S. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*, 5, 2: 94-111

- Fehsel K., Kolb-Bachofen V., Kolb H. 1991. Analysis of TNF α induced DNA strand breaks at the single cell level. *American Journal of Pathology*, 139, 2: 251-254
- Ferlini C., Di Cesare S., Rainaldi G., Malorni W., Samoggia P., Biselli R., Fattorossi A. 1996. Flow cytometric analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques. *Cytometry*, 24: 106-115
- Fesus L., Thomazy V., Falus A. 1987. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Letters*, 224, 1: 104-108
- Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M., Harbich R. 1993. Mechanisms of oxygen radiosensitization in irradiated yeast. I. DNA double-strand breakage. *International Journal of Radiation Biology*, 64, 5: 511-521
- Frankfurt O.S. 1994. Detection of apoptosis in leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer Research*, 14: 1861-1870
- Frey T. 1995. Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry*, 21: 265-274
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112
- Fu S., Davies M.J., Dean R.T. 1998. Molecular aspects of free radical damage to proteins. V: Molecular biology of free radicals in human diseases. Auroma O.I., Halliwell B. (eds.). Saint Lucia, London, OICA International: 29-56
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling for nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119: 493-501
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B., Labarre J. 1998. The H₂O₂ stimulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 22480-22489
- Gomes D.S., Fragoso L.C., Riger C.J., Panek A.D., Eleutherio E.C.A. 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573: 21-25
- Goodgame D.M.L., Hyman P.B., Hathway D.E. 1982. Carcinogenic chromium(VI) with ribonucleotides but not with deoxyribonucleotides. *Polyhedron*, 1, 5: 497-499

- Gorczyca W., Bruno S., Darzynkiewicz R.J., Gong J., Darzynkiewicz Z. 1992. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International Journal of Oncology*, 1: 639-648
- Gourlay C.W., Carpp L.N., Timpson P., Winder S.J., Ayscough K.R. 2004. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *Journal of Cell Biology*, 164, 6: 803-809
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Hanas J.S., Gunn C.G. 1996. Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotics ions. *Nucleic Acids Research*, 24, 5: 924-930
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11: 298-300
- Hart B.A., Lee C.H., Shukla G.S., Shukla A., Oiser M., Eneman J.D., Chiu J.F. 1999. Characterisation of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*, 133: 43-58
- Herker E., Jungwirth H., Lehmann K.A., Maldener C., Fröhlich K.U, Wissing S., Büttner S., Fehr M., Sigrist S., Madeo F. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 164, 4: 501-507
- Horz W. Zachau H.G. 1980. Deoxyribonuclease II as a probe for chromatin structure. I. Location of cleavage sites. *Journal of Molecular Biology*, 144: 305-327
- Hotz M.A., Traganos F., Darzynkiewicz Z. 1992. Changes in nuclear chromatin related to apoptosis or necrosis induced by the DNA topoisomerase II inhibitor fostriecin in MOLT-4 and HL-60 cells are revealed by altered DNA sensitivity to denaturation. *Experimental Cell Research*, 201: 184-191
- Hu Y., Benedict M.A., Wu D., Inohara N., Nunez G. 1998. Bcl-X_L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 4386-4391
- Huang H., Joazeiro A.P., Bonfoco E., Kamada S., Levenson J.D., Hunter T. 2000. The inhibitor of apoptosis cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 35: 26661-26664

- IARC – International Agency for Research on Cancer. 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: vol.58. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer: 444 str. (IARC Monographs: vol. 58)
- Jakubowski W., Bartosz H.R. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 29, 11: 1297-1301
- Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14: 1511-1527
- Kathakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry J., Kirschner M.W., Koths K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science, 278: 294-298
- Kayalar C., Örd T., Testa M.P., Zhong L.T., Bredesen D.E. 1996. Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibitor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 2234-2238
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 26: 239-256
- Khan A.U., Wilson T. 1995. Reactive oxygen species as cellular messengers. Chemistry & Biology, 2: 437-445
- Kim S.J., Hwang S.G., Kim I.C., Chun J.S. 2003. Actin cytoskeletal architecture regulates nitric oxide-induced apoptosis, dedifferentiation, and cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes via mitogen-activated protein kinase and protein kinase c pathways. Journal of Biological Chemistry, 278, 24: 42448-42456
- Klein C.B., Snoe E.T., Frenkel K. 1998. Molecular mechanisms in metal carcinogenesis: role of oxidative stress. V: Molecular biology of free radicals in human diseases. Auroma O.I., Halliwell B. (eds.). Saint Lucia, London, OICA Internacional: 79-137
- Koizumi T., Shirakura H., Kumagai H., Tatsumoto H., Suzuki K.T. 1996. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. Toxicology, 114: 125-134
- Koopman G., Reutelingsperger C.P.M., Kuijten G.A.M., Keehnen R.M.J., Pals S.T., van Oers M.H.J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, 84, 5: 1415-1420

- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Kreft S., Pečar S. 1998. Vloga radikalov pri obolenjih. Farmaceutski vestnik, 49: 469-481
- Kurz T., Terman A., Brunk U.T. 2007. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. Archives of Biochemistry and Biophysics, 462: 220-230
- Lag M., Westly S., Lerstad T., Bjornrud C., Refsnes M., Schwarze P.E. 2002. Cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells: involvement of Bax and p53, but not oxidative stress. Cell Biology and Toxicology, 18: 29-42
- Latterich M., Fröhlich K.U., Schekman R. 1995. Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. Cell, 82: 855-893
- Laun P., Pichova A., Madeo F., Fuchs J., Ellinger A., Kohlwein I.D., Fröhlich K.U., Breitenbach M. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. Molecular Microbiology, 39, 5: 1166-1173
- Lazarini F., Brenčič J. 1989. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 557 str.
- Lazebnik Y.A., Cole S., Cooke C.A., Nelson W.G., Earnshaw W.C. 1993. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of the active phase of apoptosis. Journal of Cell Biology, 123, 1: 7-22
- Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. 1999. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. Journal of Biological Chemistry, 274: 16040-16046
- Levine R. L., Williams J. A., Stadman E. R., Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology, 233: 346-357
- Lewin B. 2004. Genes VIII. 8th ed. New York, Pearson Prentice Hall: 1027 str.
- Ligr M., Velten I., Fröhlich E., Madeo F., Ledig M., Fröhlich K.U., Wolf D.H., Hilt W. 2001. The proteosomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. Molecular Biology of the Cell, 12: 2422-2432
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmersom R., Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell, 86: 147-157
- Lockshin R. A., Zkeri Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: 2045-20419

- Losi M.E., Amrihein C., Frankenberger Jr. W.T. 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Environmental Contamination and Toxicology*, 136: 91-115
- Ludovico P., Rodrigues F., Almeida A., Silva M.T., Barrientos A., Corte-Real M. 2002. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 2598-2606
- Madeo F., Fröhlich E., Fröhlich K.U. 1997. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 139, 3: 729-734
- Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S.J., Wolf D.H., Fröhlich K.U. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, 145, 4: 757-767
- Madeo F., Herker E., Maldener C., Wissing S., Lächelt S., Herlan M., Fehr M., Lauber K., Sigrist S.J., Wesselborg S., Fröhlich K.U. 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeasts. *Molecular Cell*, 9: 911-917
- Mager W. H., Hohmann S. 1997. Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Heidelberg, Spinger-Verlag: 1-5
- Manček B., Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farmaceutski vestnik*, 52: 133-144
- Manzoni C., Mancini P., Verdone L., Madeo F., Sefarini A., Herker E., Falcone C. 2003. A truncated form of KILsm4p and the absence of factors involved in mRNA decapping trigger apoptosis in yeasts. *Molecular Biology of the Cell*, 14: 721-729
- Mattagahasingh S.N., Misra H.P. 1999. Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium(VI) in cultured intact human cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199: 149-162
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19, 4: 651-658
- Murugavel P., Pari L., Sitasawad S.L., Kumar S., Kumar A. 2007. Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 161-170
- Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H., Tsujimoto Y. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 14681-14686

- Naruse I., Keino H., Kawarada Y. 1994. Antibody against single-stranded DNA detects both programmed cell death and drug-induced apoptosis. *Histochemistry*, 101: 73-78
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Lehninger. Principles of biochemistry. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 1152 str.
- Olive P.L., Frazer O.G., Banáth J.P. 1993. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiation Research*, 136: 130-136
- Orlandi I., Bettiga M., Alberghina L., Vai M. 2004. Transcriptional profiling of *ubp10* null mutant reveals altered subtelomeric gene expression and insurgence of oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 8: 6414-6425
- Ozawa T., Hanaki A. 1990. Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of biological reductants: is Cr(III) non-toxic? *Biochemistry International*, 22, 2: 343-352
- Patterson H.G., Landel C.C., Landsman D., Peterson C.L., Simpson R.T. 1998. The biochemical and phenotypic characterization of hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 7268-7276
- Petite P.X., Lecoeur H., Zorn E., Dauguet C., Mignotte B. 1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone induced thymocyte apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 30, 1: 157-168
- Pozniakovsky A.I., Knorre D.A., Markova O.V., Hyman A.A., Skulachev V.P., Severin F.F. 2005. Role of mitochondria in the pheromone- and aminodarone-induced programmed death of yeast. *Journal of Cell Biology*, 168: 257-269
- Price D.J., Joshi J.G. 1983. Ferritin: binding of beryllium and other divalent metal ions. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 18: 10873-10880
- Pritchard D.E., Ceryak S., Ha L., Fornasaglio J.L., Hartman S.K., O'Brein T.J., Patierno S.R. 2001. Mechanism of apoptosis and determination of cellular fate in chromium(VI)-exposed populations of telomerase-immortalized human fibroblasts. *Cell Growth & Differentiation*, 12: 487-496
- Rudolf E., Cervinka M., Cerman J., Schroterova L. 2005. Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 19: 713-723
- Qi H., Li T.K., Kuo D., Nur-E-Kamal A., Liu L.F. 2003. Inactivation of Cdc13p triggers *MEC1*-dependent apoptotic signals in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 17: 15136-15141

- Salgame P., Varadhachary A.S., Primiano L.L., Fincke J.E., Muller S., Monestier M. 1997. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acid Research*, 25, 3:680-681
- Santoro N., Thiele D.J. 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager, W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 171-211
- Schröter W., Lautenschläger K.H., Birbrack H., Schnabel A. 1993. *Kemija: splošni priročnik*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 712 str.
- Schulz J.B., Bremen D., Reed J.C., Lommatzsch J., Takayama S., Wüllner U., Löschmann P.A., Klockgether T. Weller M. 1997. Cooperative interception in neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *Journal of Neurochemistry*, 69: 2075-2086.
- Schulz J.B., Weller M., Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebella granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*, 16, 15: 4696-4706
- Schweich J.U., Merker H.J. 1973. Morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7, 7: 253-266 cit. po: Lockshin R. A., Zkeri Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 2045-20419
- Senbongi H., Ling F., Shibata T. 1999. A mutation in a mitochondrial ABC transporter results in mitochondrial dysfunction through oxidative damage of mitochondrial DNA. *Molecular & General Genetics*, 262: 426-436
- Shi X., Dalal N.S. 1990a. ESR spin trapping detection of hydroxyl radicals in the reactions of Cr(V) complexes with hydrogen peroxide. *Free Radical Research Communications*, 10: 17-26
- Shi X., Dalal N.S. 1990b. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277: 342-350
- Shi X., Dalal N.S. 1990. NADPH-dependent flavoenzymes catalyze one electron reduction of metal ions and molecular oxygen and generate hydroxyl radicals. *FEBS Letters*, 276, 1-2: 189-191
- Shi X., Dong Z., Dalal N.S., Gannett P.M. 1994. Chromate-mediated free radical generation from cysteine, penicillamine, hydrogen peroxide, and lipid hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1226: 65-71

- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms – I. *Folia Microbiologica*, 44,6: 587-624
- Sokolov S., Knorre D., Smirnova E., Matkova O., Pozniakovsky A., Skulachev V., Severin F. 2006. Ysp2 mediates death of yeast induced by amiodarone or intracellular acidification. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757: 1366-1370
- Sperandio S., de Belle I., Bredesen D.E. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 26: 14376-14381
- Srinivasan A., Roth K.A., Sayers R.O., Shindler K.S., Wong A.M., Fritz L.C., Tomaselli K.J. 1998. In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death and Differentiation*, 5: 1004-1016
- Stohs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 2: 321-336
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441-446
- Suzuki Y., Nakabayashi T., Takahashi R. 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 15: 8662-8667
- Sylte M., O'Brein M., Inzana T.J., Czuprynski C. 2000. CaspACETM FITC-VAD-FMK in situ marker for apoptosis: applications for flow cytometry. *Promega Notes*, 75: 20-23
- Štiblar Martinčič D. 1998. Morfološke spremembe med apoptozo. *Medicinski razgledi*, 37: 191-198
- Šuput D. 2001. Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih. V: *Izbrana dela iz patološke fiziologije*. Ribarič S. (ed). 9. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo: 25-36
- Thiele D.J. 1992. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 20, 6: 1183-1191
- Traganos F., Darzynkiewicz Z. 1994. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leucocytes subpopulations. *Methods in Cell Biology*, 41: 185-195

- Trevors J.T., Stratton G.W., Gadd G.M. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 32: 447-464
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazu M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40
- Vayssiere J.L., Petit P.X., Risler Y., Mignotte B. 1994. Commitment to apoptosis in asociated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionly immortalized with simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 11752-11756
- Xu X., Gerard A.L.V., Huang B.C.B., Anderson D.C., Payan D.G., Luo Y. 1998. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 26, 8: 2034-2035
- Wang Z.Q., Stigl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K., Wagner E.F. 1997. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes & Development*, 11: 2347-2358
- Wätjen W., Beyersmann D. 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: infuence of oxidative stress. *Biometals*, 17: 65-78
- Willingham M.C. 1999. Cytochemical methods for detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47, 9: 1101-1109
- Yamaki M., Umehara T., Chimura T., Horikoshi M. 2001. Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone *ASF1/CIA1*. *Genes to Cells*, 6: 1043-1054
- Ye J., Wang S., Leonard S.S., Sun Y., Butterworth L., Antonini J., Ding M., Rojanasakul Y., Vallayathan V., Castranova V., Shi X. 1999. Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 49: 34974-34980
- Zhang A., Wu Y., Lai H.W.L., Yew D.T. 2005. Apotosis – a brief review. *Neuroembryology*, 3: 47-59
- Zhao M., Antunes F., Eaton J.W., Brunk U.T. 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3778-3786
- Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M. 1995. Glutathione and free amino acids form stable complexes with DNA following exposure of intact mammalian cells to chromate. *Carcinogenesis*, 16, 4: 907-913

Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium *in vitro*: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry*, 35: 7275-7282

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Petru Rasporju, in recenzentu, prof. dr. Kristijanu Jezerniku, za strokovno opravljeno delo. Mentorju bi se rada še posebej zahvalila, ker mi je omogočil opravljanje praktičnega dela diplome v tujini. Na tem mestu se želim zahvaliti še za gostoljubje prof. dr. Pedru Moradas-Ferreira in njegovima sodelavcema, dr. Vitorju Costa in dr. Hugu Osorio. Obrigada!

Pri delu mi je največ pomagala dr. Polona Jamnik. Hvala, da ste bili ves čas konstruktivno kritični, nepristranski, razpoložljivi za nasvete vseh vrst, da ste me moralno in emotivno spodbujali, da ste moje delo namanj petkrat prebrali in nenazadnje hvala, da ste mi povedali, kateri mestni avtobus pelje do inštituta IBMC ter katere znamenitosti Porta si je vredno ogledati. Tihe vode globoko derejo.

Hvala vsem najbližjim. Hvala, ker ste z mano delili skrbi in vznemirjenost pred izpiti, me bodrili ves čas študija, me klicarili na Portugalsko, da bi preverili, ali sem še živa, ... Andreja, hvala, ker si verjela vame.

PRILOGE

Priloga A: OD₆₀₀ v odvisnosti od časa med kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (26 °C, 120 obr./min)

čas [h]	OD ₆₀₀
0	0,0118
1	0,0249
2	0,0373
3	0,0564
4	0,0950
5	0,1590
6	0,2010
7	0,3450
8	0,4600
9	0,6620
10	0,9240
11	0,9680
12	1,0020
13	1,0200

Priloga B1: Povprečen odstotek živih celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah (Cr₂O₇)²⁻ po 30 minutah inkubacije (26 °C, 120 obr./min)

(Cr ₂ O ₇) ²⁻ [mM]	% živih celic ± SD
0	100,00 ± 0,00
2	96,60 ± 18,83
4	40,60 ± 5,62
5	11,65 ± 6,23
10	3,45 ± 2,59
20	0,25 ± 0,50

Priloga B2: Povprečen odstotek živih celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v logaritemski fazi rasti pri različnih koncentracijah CdCl₂ po 30 minutah inkubacije (26 °C, 120 obr./min)

(CdCl ₂) [mM]	% živih celic ± SD
0	100,00 ± 0,00
5	108,45 ± 24,05
10	63,03 ± 20,62
15	7,35 ± 7,57
30	0,80 ± 1,13

Prologa C: Rezultati pretočne citometrije: odstotek fluorescentnih celic v vsakem vzorcu kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* po 30-min inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)

vzorec	opis vzorca	% fluorescentnih celic
1	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	0,00
2	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 10 mM CdCl ₂	0,00
3	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻	0,00
4	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> z H ₂ DCFDA	0,00
5	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> z H ₂ DCFDA	0,00
6	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 10 mM CdCl ₂ z H ₂ DCFDA	3,87
7	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 10 mM CdCl ₂ z H ₂ DCFDA	2,87
8	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻ z H ₂ DCFDA	40,35
9	celice kvasovk <i>S. cerevisiae</i> , izpostavljene 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻ z H ₂ DCFDA	41,96

Priloga D: Rezultati pretočne citometrije: določanje aktivnosti kaspaz pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* po 2-h inkubaciji (T = 26 °C in 120 obr./min)

vzorec	opis vzorca	% FITC-VAD-FMK pozitivnih celic	% PI in FITC-VAD-FMK pozitivnih celic	% apoptotskih celic
1	wt po 2-h izpostavitvi 3 mM H ₂ O ₂	53,85	12,9	40,95
2	celice kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155	65,39	17,95	47,44
3	celice kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155 po 2-h izpostavitvi 4 mM (Cr ₂ O ₇) ²⁻	21,59	19,34	2,25