

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina TRBUHA

**VPLIV SLANOSTI NA TRANSKRIPCIO GENOV ZA ENCIME, KI
SODELUJEJO PRI MODIFIKACIJI MAŠČOBNIH KISLIN PRI
HALOTOLERANTNI ČRNI KVASOVKI *Aureobasidium pullulans***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF SALINITY ON THE TRANSCRIPTION OF
GENES ENCODING ENZYMES INVOLVED IN MODIFICATIONS
OF FATTY ACIDS IN HALOTOLERANT BLACK YEAST
*Aureobasidium pullulans***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Analize z radioaktivnimi reagenti so potekale na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico dr. Martino Turk in za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman
Somentorica: dr. Martina Turk
Recenzentka: prof. dr. Ana Plemenitaš

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Martina TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ana PLEMENITAŠ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Trbuha

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.222: 579.258: 577.151.5: 582.282.23(043) = 163.6
KG halotolerantni mikroorganizmi/kvasovke/halotolerantne kvasovke/*Aureobasidium pullulans*/stres/slanost/hiperosmotski stres/hipoosmotski stres/transkripcija genov/maščobne kisline/encimi/desaturaze/elongaze
AV TRBUHA, Tina
SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/TURK, Martina (somentorica)/PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN VPLIV SLANOSTI NA TRANSKRIPCIO GENOV ZA ENCIME, KI SODELUJEJO PRI MODIFIKACIJI MAŠČOBNIH KISLIN PRI HALOTOLERANTNI ČRNI KVASOVKI *Aureobasidium pullulans*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 56 str., 1 pregl., 14 sl., 2 pril., 82 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Aureobasidium pullulans* je ubikvitarna črna kvasovka, ki je pogosta v osmotsko stresnih okoljih. Zaradi svoje halotolerantne narave je primeren modelni organizem za proučevanje odpornosti proti povišanim koncentracijam soli pri evkariontih. Glavni prilagoditvi celic na takšne razmere sta kopičenje glicerola kot kompatibilnega topljenca ter sprememba fluidnosti in lipidne sestave membran, med drugim na račun povečanja deleža nenasičenih maščobnih kislin. V okviru diplomskega dela smo preverjali hipotezo, da so te spremembe posledica spremenjenega izražanja genov za encime, ki modificirajo maščobne kisline. Pri tem smo se osredotočili na dve desaturazi in elongazo. V genomu *A. pullulans* smo poiskali delna nukleotidna zaporedja za Δ^9 -desaturazo (*ApOLE1*), Δ^{12} -desaturazo (*ApODE12*) in elongazo (*ApELO1*). Z analizo prenosa po Southernu smo ugotovili, da je gen za Δ^9 -desaturazo prisoten vsaj v dveh kopijah, ostala dva gena pa v eni. Z verižno reakcijo s polimerazo na cDNA prepisu celične mRNA smo preučili transkripcijo teh genov v celicah, ki so rasle pri različnih koncentracijah NaCl. Ugotovili smo, da transkripcija genov za Δ^{12} -desaturazo in elongazo narašča z naraščanjem slanosti, transkripcija gena za Δ^9 -desaturazo pa je statistično značilno povečana le pri najvišji testirani slanosti (13 % NaCl (m/v)). Ob hiperosmotskem stresu (prenosu celic iz gojišča brez soli v gojišče z 10 % NaCl (m/v)) se je transkripcija gena za Δ^9 -desaturazo zmanjšala eno uro po začetku stresa, transkripcija genov za Δ^{12} -desaturazo in elongazo pa se je zmanjšala že po petih minutah. Ob hipoosmotskem stresu (prenosu celic iz gojišča z 10 % NaCl (m/v) v gojišče brez soli) se je transkripcija vseh treh genov prehodno povečala in nato zopet zmanjšala. Raziskava je pokazala, da je maščobnokislinska sestava membranskih lipidov celic *A. pullulans* deloma uravnana s kontrolo transkripcije genov za encime, ki sodelujejo v modifikaciji maščobnih kislin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.222: 579.258: 577.151.5: 582.282.23(043) = 163.6
CX halotolerant microorganisms/yeasts/halotolerant yeasts/*Aureobasidium pullulans*/ stress/salinity/hiperosmotic stress/hipoosmotic stress/gene transcription/fatty acids/ enzymes/desaturases/elongases
AU TRBUHA, Tina
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/TURK, Martina (co-advisor)/ PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI THE INFLUENCE OF SALINITY ON THE TRANSCRIPTION OF GENES ENCODING ENZYMES INVOLVED IN MODIFICATIONS OF FATTY ACIDS IN HALOTOLERANT BLACK YEAST *Aureobasidium pullulans*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 56 p., 1 tab., 14 fig., 2 ann., 82 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Aureobasidium pullulans* is a ubiquitous black yeast often found in osmotically stressed habitats. Its halotolerant nature makes it a suitable model organism for studying mechanisms of salt tolerance in eukaryotes. Accumulation of glycerol as a compatible solute and changes in membrane fluidity and lipid composition are the main adaptations to increased environmental salinity. At higher salinities the proportion of unsaturated fatty acids increases. We assumed that this is due to alterations in expression of fatty-acid-modifying enzymes. The present study focused on two different fatty acid desaturases and a fatty acid elongase. We identified partial DNA sequences of the homologue genes for Δ^9 - and Δ^{12} -desaturases (*ApOLE1* and *ApODE12*, respectively) and a fatty acid elongase (*ApELO1*). Southern blot analysis of the genomic DNA demonstrated that there are at least two copies of *ApOLE1* and one of each *ApODE12* and *ApELO1* in the genome of *A. pullulans*. For cells grown at different salinities and those exposed to osmotic shock transcription profiles for the examined genes were established by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). While the transcription of *ApODE12* and *ApELO1* increased with increasing salinity, the transcription of *ApOLE1* only increased at the highest salinity tested (13 % NaCl (m/v)). When cells were transferred from the medium without salt to the one with 10 % NaCl (m/v) the transcription of both *ApODE12* and *ApELO1* dropped immediately while the transcription of *ApOLE1* decreased only one hour after the hiperosmotic shock. Hipoosmotic shock (transfer from 10 % to 0 % NaCl (m/v)) had equal effect on all three genes: their transcription increased in the beginning and then decreased. Our research showed that the fatty acid composition of membrane lipids of *A. pullulans* cells is partially regulated by the transcription control of the genes encoding enzymes involved in fatty acids modification.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HIPERSLANA OKOLJA	3
2.1.1 Prilagoditve organizmov	4
2.1.1.1 Uravnavanje vodne aktivnosti znotraj celice	4
2.1.1.1.1 Akumulacija anorganskih soli	4
2.1.1.1.2 Akumulacija kompatibilnih topljencev	5
2.1.1.2 Prilagoditve celičnih membran	5
2.1.2 Odziv organizmov na slanostni stres	5
2.2 <i>Aureobasidium pullulans</i>	7
2.2.1 Taksonomska klasifikacija	7
2.2.2 Morfologija	7
2.2.3 Habitat	8
2.2.4 Gospodarski in tehnološki pomen	9
2.2.5 <i>A. pullulans</i> v slanem okolju	9
2.3 CELIČNE MEMBRANE	10
2.3.1 Vpliv soli na membrane	10
2.3.2 Značilnosti celičnih membran pri organizmih, ki rastejo v slanem okolju	11
2.3.3 Odziv membran na slanostni stres	12
2.4 MAŠČOBNE KISLINE	12
2.4.1 Metabolizem maščobnih kislin	13
2.4.1.1 Sinteza maščobnih kislin	13
2.4.1.2 Razgradnja maščobnih kislin	13
2.4.1.3 Privzem maščobnih kislin iz okolja	13
2.4.1.4 Uravnavanje lipidnega metabolizma	14
2.4.2 Desaturacija maščobnih kislin	15
2.4.2.1 Struktura in delovanje desaturaz	15
2.4.2.2 Nadzor delovanja desaturaz	16
2.4.3 Elongacija maščobnih kislin	17
2.4.3.1 Struktura in delovanje elongaz	18
2.4.3.2 Nadzor delovanja elongaz	18

3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 MIKROORGANIZMI IN POGOJI RASTI	20
3.1.1 Gliva	20
3.1.1.1 Sev	20
3.1.1.2 Gojišče	20
3.1.1.3 Gojenje	20
3.1.2 Bakterija	21
3.1.2.1 Sev	21
3.1.2.2 Gojišča	21
3.1.2.3 Gojenje	22
3.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNA <i>A. pullulans</i>	22
3.3 AGARozNA ELEKTROFOREZA DNA	24
3.4 IZOLACIJA CELOKUPNE RNA	24
3.5 DOLOČANJE DELNEGA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOV	25
3.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	25
3.5.2 Kloniranje dela gena za elongazo	26
3.6 DOLOČANJE ŠTEVILA GENOV ZA DESATURAZI IN ELONGAZO Z ANALIZO ODTISA PO SOUTHERNU	26
3.6.1 Priprava vzorcev, elektroforeza in prenos na membrano	27
3.6.2 Hibridizacija	28
3.7 IZDELAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA NAMNOŽITEV KRATKIH DELOV GENOV ZA DESATURAZI IN ELONGAZO	28
3.8 OBRATNA TRANSKRIPCIJA IN HKRATNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	29
3.8.1 Priprava komplementarne DNA (cDNA)	29
3.8.2 Hkratna verižna reakcija s polimerazo (hkratni PCR)	29
3.8.3 Standardizacija in statistična obdelava podatkov	30
4 REZULTATI	32
4.1 DELNO NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE GENOV	32
4.1.1 Δ^9 -desaturaza	32
4.1.2 Δ^{12} -desaturaza	32
4.1.3 Elongaza	33
4.2 ANALIZA PRENOSA PO SOUTHERNU	33
4.2.1 Gen za Δ^9 -desaturazo	33
4.2.2 Gen za Δ^{12} -desaturazo	34
4.2.3 Gen za elongazo	35
4.3 PREPISOVANJE GENOV ZA DESATURAZI IN ELONGAZO MAŠČOBNIH KISLIN V <i>A. pullulans</i>	36
4.3.1 Δ^9 -desaturaza	36
4.3.2 Δ^{12} -desaturaza	38
4.3.3 Elongaza	40
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.2 RAZPRAVA	43
5.1.1 Izražanje genov pri stalni koncentraciji soli v gojišču	43
5.1.1.1 <i>ApOLE1</i> , domnevni gen za Δ^9 -desaturazo	43
5.1.1.2 <i>ApODE12</i> , domnevni gen za Δ^{12} -desaturazo	44

5.1.1.3 <i>ApELO1</i> , domnevni gen za elongazo	45
5.1.2 Izražanje genov pri stresu zaradi povečanja slanosti gojišča	45
5.1.3 Izražanje genov pri stresu zaradi zmanjšanja slanosti gojišča	46
6 POVZETEK	48
7 VIRI	50
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Število genov, katerih izražanje se po izpostavljenosti slanostnemu stresu spremeni (Posas in sod., 2000; Yale in Bohnert, 2001; Rep in sod., 2000).....	6

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Celice halotolerantne črne kvasovke <i>A. pullulans</i>	8
Slika 2: Avtoradiogram genomske DNA za gen <i>ApOLE1</i> , rezane z restrikcijskimi endonukleazami <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> in <i>BamHI</i>	34
Slika 3: Avtoradiogram genomske DNA za gen <i>ApODE12</i> , rezane z restrikcijskimi endonukleazami <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> in <i>BamHI</i>	35
Slika 4: Avtoradiogram genomske DNA za gen <i>ApELO1</i> , rezane z restrikcijskimi endonukleazami <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> in <i>BamHI</i>	36
Slika 5: Transkripcija gena <i>ApOLE1</i> v celicah, vzgojenih v gojiščih z različnimi deleži dodane soli.....	37
Slika 6: Transkripcija gena <i>ApOLE1</i> v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega povečanja deleža soli v gojišču.....	37
Slika 7: Transkripcija gena <i>ApOLE1</i> v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega zmanjšanja deleža soli v gojišču.....	38
Slika 8: Transkripcija gena <i>ApODE12</i> v celicah, vzgojenih v gojiščih z različnimi deleži dodane soli.....	39
Slika 9: Transkripcija gena <i>ApODE12</i> v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega povečanja deleža soli v gojišču.....	39
Slika 10: Transkripcija gena <i>ApODE12</i> v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega zmanjšanja deleža soli v gojišču.....	40
Slika 11: Transkripcija gena <i>ApELO1</i> v celicah, vzgojenih v gojiščih z različnimi deleži dodane soli.....	41
Slika 12: Transkripcija gena <i>ApELO1</i> v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega povečanja deleža soli v gojišču.....	41
Slika 13: Transkripcija gena <i>ApELO1</i> v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega zmanjšanja deleža soli v gojišču.....	42
Slika 14: Transkripcijski profil gena <i>ApOLE1</i> kot vsota transkripcijskih profilov dveh izogenov.....	44

KAZALO PRILOG

PRILOGA A1:

Seznam začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo namnožili dele genov, ki smo jim nato določali nukleotidno zaporedje.

PRILOGA A2:

Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v hkratni verižni reakciji s polimerazo.

.

PRILOGA B:

Delna zaporedja genov, ki smo jih identificirali v raziskavi.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACP - proteinski prenašalec acilne skupine

ApELO1 - gen za elongazo maščobnih kislin v kvasovki *A. pullulans*

ApODE12 - gen za Δ^{12} -desaturazo maščobnih kislin v kvasovki *A. pullulans*

ApOLE1 - gen za Δ^9 -desaturazo maščobnih kislin v kvasovki *A. pullulans*

bp - bazni par (v DNA)

CoA - koencim A

DEPC - dietilpirokarbonat

HOG - signalna pot odziva na povečano slanost (High Osmolarity Glycerol response pathway)

kb - kilobazni par, 1000 baznih parov (prim. bp)

OLE1 - gen za Δ^9 -desaturazo maščobnih kislin v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*

PCR - verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR - obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

YNB - trdno sintetsko definirano gojišče Yeast Nitrogen Base

SLOVARČEK

- desaturaza - encim, ki katalizira nastanek dvojne vezi v acilnih verigah maščobnih kislin
- elongaza - encim, ki na že obstoječe maščobne kisline dodaja enote z dvema C atomoma in tako tvori maščobne kisline z dolgimi in zelo dolgimi verigami
- halotolerantni organizmi - organizmi, ki lahko preživijo in se razmnožujejo v okolju s povečano koncentracijo soli
- hiperosmotski - z relativno manjšo vodno aktivnostjo: raztopina A je hiperosmotska glede na raztopino B, če vsebuje večjo koncentracijo topljenca/topljencev kot raztopina B
- hiposmotski - z relativno večjo vodno aktivnostjo: raztopina A je hiposmotska glede na raztopino B, če vsebuje manjšo koncentracijo topljenca/topljencev kot raztopina B

1 UVOD

Ekstremofilni organizmi že vse od njihovega odkritja zbujejo veliko zanimanje znanstvenikov. Premaknili so meje našega razumevanja živega sveta in zanimanje zanje še vedno hitro narašča. Danes obsegajo raziskave ekstremofilov tako proučevanje prilagoditev na ekstremna okolja, kot tudi uporabo živih organizmov in njihovih delov (posebno encimov) na različnih področjih, od industrije in kmetijstva do medicine in varstva narave. Raziskave se od prokariontov, ki so dolgo veljali za edine ekstremofile, zadnja leta vedno bolj usmerjajo tudi k redkim že poznanim, pa tudi novo odkritim evkariontskim vrstam.

Zasoljevanje kmetijskih površin predstavlja velik problem tako za razvite države kot za države v razvoju. Namakanje z vodo neustrezne kakovosti v sušnih predelih spreminja prej plodna tla v nerodovitno puščavo, v kateri kulturne rastline ne morejo uspevati. Razvijanje proti soli odpornih poljščin s konvencionalnimi metodami je dolgotrajno in drago, poleg tega pa še ni dalo zadovoljivih rezultatov. Če bi poznali mehanizme toksičnosti soli in odzive odpornih vrst na molekularni ravni, bi lahko povečali odpornost kmetijsko pomembnih rastlin z genskim inženirstvom. Za ta namen so še posebno zanimivi proti soli odporni evkariontski mikroorganizmi, saj so rastlinam evolucijsko in fiziološko mnogo bližje kot prokarionti. Primer evkariontskega halotolerantnega organizma je *Aureobasidium pullulans*, ubikvitarna črna kvasovka, ki pri rasti v vodnem mediju prenese do 17 % NaCl (m/v) (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

1.1 NAMEN DELA

Predhodne raziskave so pokazale, da je lipidna sestava celičnih membran glive *A. pullulans* ob rasti pri višjih koncentracijah soli drugačna kot v okolju brez soli (Turk in sod., 2004). Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali so za spremembe membranskih lipidov odgovorne spremembe v transkripciji encimov, ki so udeleženi pri modifikaciji maščobnih kislin. Ker se je pri višjih slanostih povečal predvsem delež maščobnih kislin z dvojnimi vezmi ob devetem in dvanajstem ogljikovem atomu (Turk in sod., 2004), smo predpostavili, da sta v celici prisotni vsaj Δ^9 - in Δ^{12} -desaturazi. Pri ekstremno halotolerantni črni kvasovki *Hortaea werneckii*, izolirani iz istega okolja kot *A. pullulans*, pri višjih slanostih naraste tudi delež maščobnih kislin z daljšimi acilnimi verigami (Turk in sod., 2004), kar je verjetno posledica povečanega izražanja gena za elongazo (Gostinčar, 2004). Zanimalo nas je, ali je tudi v genomu halotolerantnega *A. pullulans* gen za elongazo in kakšno je njegovo izražanje pri različnih slanostih. Cilji naše raziskave so bili identifikacija genov za desaturazi in elongazo v genomu *A. pullulans*, ugotovitev števila kopij teh genov, preučitev profila transkripcije teh genov v odvisnosti od slanosti okolja ter ugotavljanje sprememb v njihovi transkripciji ob izpostavitvi celic nenadnemu povečanju ali zmanjšanju koncentracije soli v okolju.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Na podlagi sprememb v deležih posameznih maščobnih kislin v membranah, ki so jih preučili Turk in sod. (2004), smo postavili hipotezo, da se ob višjih koncentracijah soli transkripcija genov za desaturazi poveča, transkripcija gena za elongazo pa ostane nespremenjena. V skladu s tem smo domnevali, da se transkripcija genov za desaturazi poveča po hiperosmotskem šoku ter zmanjša po hipoosmotskem, transkripcija gena za elongazo pa se na osmotski šok ne odzove.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HIPERSLANA OKOLJA

Na Zemlji obstajajo številna fizikalno in kemijsko raznolika okolja, ki omogočajo razvoj in obstoj življenja. Povsod, kjer živijo višji organizmi, najdemo tudi mikroorganizme. Slednji pa so zmožni preživeti in uspevati tudi tam, kjer eden ali več dejavnikov okolja onemogoča obstoj višjih organizmov. Takšna so npr. področja zelo visokih ali nizkih temperatur (geotermalna območja, polarni pas...), ekstremnega pH (alkalna jezera, kislavulkanska tla, rudniške odcedne vode...) in področja z zmanjšano dostopnostjo vode (slana jezera, površina skal...). Za mikroorganizme, ki so se takšnih okoljih razvijali in se jim skozi generacije prilagodili, so takšne razmere povsem normalne, s stališča človeka pa so tovrstna okolja ekstremna in organizme, ki v njih živijo, imenujemo ekstremofili.

Najobsežnejše življenjsko okolje na Zemlji predstavljajo vode oceanov in morij, ki skupaj pokrivajo 71 % zemeljskega površja. Čeprav vsebuje morska voda v povprečju 3 % NaCl (m/v), kar onemogoča rast večini kopenskih in sladkovodnih organizmov, pa nam obsežnost oceanov in morij ter delež vrst, ki tam živijo, preprečuje, da bi jih poimenovali ekstremno okolje. Vendar pa obstajajo tudi območja, kjer je koncentracija soli precej višja od 3 %. Takšna hiperslana okolja nastanejo tam, kjer se v vodi raztopljene soli kopičijo zaradi izhlapevanja vode. Nastanek tovrstnih okolij je največkrat naraven (npr. jezera brez odtoka v sušnih podnebjih, morske plitvine z malo kroženja vode), lahko pa je tudi posledica človekovega delovanja. Značilen primer za to so sončne soline, kjer se koncentracija soli v morski vodi postopno povečuje od 3 % (m/v) pa vse do nasičenosti pri več kot 30 % NaCl (m/v).

Organizmi, ki živijo v takšnih okoljih, so podvrženi osmotskemu pritisku, na katerega so bolj ali manj prilagojeni. Na podlagi tega, ali sol za svojo rast potrebujejo ali pa jo zgolj tolerirajo, jih delimo na halofilne in halotolerantne, znotraj teh dveh razredov pa včasih še dalje na rahlo, zmerno in ekstremno halofilne oz. halotolerantne (Russel, 1989). Kot skupina ti organizmi uspevajo v vsem spektru slanosti, le redke pa najdemo v celotnem razponu od nekaj mM soli pa do nasičenih raztopin. Takšna sta npr. bakterija *Micrococcus varians* spp. *halophilus* in enocelična zelena alga *Dunaliella salina* (Russel, 1989), pa tudi nekatere glive, npr. halofilna *Wallemia ichthyophaga* (Zalar in sod., 2005), ekstremno halotolerantna *Hortaea werneckii* ter halotolerantni *Trimmatostroma salina* in *Phaeotheca triangularis* (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

Glavna težava, s katero se srečujejo organizmi v teh okoljih, je dostopnost proste vode. V vodi raztopljene soli vežejo molekule vode nase, s tem pa jih odtegnejo (mikro)organizmom. Dostopnost vode lahko opišemo na več načinov: kot vodni potencial, osmotski potencial, kemijski potencial vode, osmotski tlak ali osmolalnost. Mera za dostopnost vode, ki jo največkrat uporabljamo v povezavi z mikroorganizmi, pa je vodna aktivnost (water activity, a_w). Izražena je kot razmerje med parnim tlakom nad raztopino in

parnim tlakom čiste vode pri isti temperaturi. Vrednosti a_w so tako med 0 in 1. Večina mikroorganizmov potrebuje za aktivni metabolizem vrednost a_w nad 0,96, nekatere filamentozne glive in lišaji pa lahko rastejo tudi še pri vrednosti $a_w = 0,60$ (Atlas in Bartha, 1998). Najpogosteje uporabljena dogovorjena meja, pod katero lahko uspevajo izključno ekstremofilni organizmi, je $a_w = 0,85$, kar ustreza 17 % (m/v) NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2004; Gunde-Cimerman in sod., 2005).

Halofilne in halotolerantne mikroorganizme najdemo v vseh treh kraljestvih: *Archaea*, *Bacteria* in *Eucarya* (Madigan in Oren, 1989). Kljub biološki različnosti med temi organizmi pa so odgovori na izzive, ki jih pred njih postavlja okolje, do neke mere podobni.

2.1.1 Prilagoditve organizmov

2.1.1.1 Uravnavanje vodne aktivnosti znotraj celice

Voda osmotsko prehaja skozi polprepustno membrano iz območja z višjo v območje z nižjo vodno aktivnostjo (a_w). Raztopina z nizko a_w ima tako na organizme podoben vpliv kot sušno okolje, iz celic izstopi voda, kar v skrajnem primeru privede do plazmolize (Madigan in sod., 2000). Ker je prehajanje vode skozi membrano fizikalen proces, na katerega organizmi nimajo neposrednega vpliva, se lahko le-ti izgubi vode v mediju z visoko koncentracijo soli izogonejo le tako, da izenačijo vodno aktivnost znotraj in zunaj celice. To dosežejo tako, da povečajo znotrajcelično koncentracijo topljencev.

2.1.1.1.1 Akumulacija anorganskih soli

Arheje iz reda halobakterij (*Halobacteriales*) in anaerobne halofilne bakterije (red *Haloanaerobiales*) v citoplazmi akumulirajo K^+ in Cl^- ione v molarnih koncentracijah. Čeprav bi bilo v okolju, kjer prevladuje NaCl, na prvi pogled za organizme preprosteje, če bi poleg Cl^- kopičili Na^+ ione, se ti v citoplazmi nahajajo le v manjši meri in se npr. pri halobakterijah aktivno izčrpavajo z Na^+/H^+ antiporterjem, K^+ pa nato verjetno vstopi v celice pasivno (Madigan in Oren, 1989). Verjetna razlaga za odsotnost večjih koncentracij Na^+ ionov v citoplazmi je njihova citotoksičnost, saj zaradi podobnosti s K^+ ioni slednje izpodrinejo iz njihovih vezavnih mest v encimih (Hohmann, 2002; Maathuis in Amtmann, 1999).

Pri organizmih, ki v celicah kopičijo anorganske soli, visoka ionska jakost citoplazme zahteva od makromolekul določene prilagoditve. Značilno za proteine halobakterij je, da imajo v svoji primarni strukturi več kislih aminokislin, ki so večinoma razporejene na površini proteina (Madigan in Oren, 1989; Russel, 1999). K^+ ioni so morda potrebni, da deloma zakrijejo te negativne naboje (v okolju z manj kot 1-2 M soli ti proteini denaturirajo), sicer pa hidrofilnost kislih aminokislin, še posebno glutamata, zagotavlja ustrezen hidratacijski plašč in s tem pravilno zvitost proteina (Madigan in Oren, 1989).

Elcock in McCannon (1998) pa sta na podlagi teoretične analize elektrostatskih interakcij predpostavila, da je negativni naboj kislih aminokislinskih ostankov bolj kot za ohranjanje notranje stabilnosti proteinov pomemben za preprečevanje njihove agregacije.

Poleg kislih aminokislin imajo proteini halobakterij večji delež manj hidrofobnih aminokislin, kar verjetno prepreči, da bi se proteini v okolju z nizko vodno aktivnostjo pretrdno zvali ali agregirali (Lanyi, 1974).

2.1.1.1.2 Akumulacija kompatibilnih topljencev

Večina halofilnih bakterij, halofilne metanogene arheje, alge in glive ohranjajo v citoplazmi nizke koncentracije soli, vodno aktivnost pa uravnavajo z majhnimi organskimi molekulami, ki jih sintetizirajo same ali pa jih pridobijo iz ravnega medija (Oren, 1999). Slednje še posebno velja za mikroorganizme, ki kvarijo hrano, saj se nahajajo v okolju, bogatem z organskimi snovmi (Russel, 1995). Ti t.i. kompatibilni topljenci so polarne, močno vodotopne molekule, ki so pri fiziološkem pH nenabite ali v obliki ionov dvojčkov. Kemično so kompatibilni topljenci polioli (glicerol, arabitol...), sladkorji in sladkorni derivati (saharoza, trehaloza, glukozil-glicerol...), aminokislina in njihovi derivati ter kvartarni amini (glicin betain) (Oren, 1999). Prilagoditve proteinov zaradi prisotnosti kompatibilnih topljencev niso potrebne, nasprotno, kompatibilni topljenci stabilizirajo encime in druge proteine ter membrane in tudi v visokih molarnih koncentracijah omogočajo njihovo normalno delovanje – odtod tudi njihovo ime (Oren, 1999; Russel in sod., 1995).

2.1.1.2 Prilagoditve celičnih membran

Glavna sestavina celičnih membran so fosfolipidi. Njihove fizikalne lastnosti so močno odvisne od dejavnikov okolja, kot so temperatura, pH, tlak, vodna aktivnost in prisotnost ionov. Dejansko noben drug razred bioloških molekul ne kaže tako velike strukturne diverzitete v tako ozkem razponu nihanj fizikalnih in kemičnih parametrov (Hazel in Williams, 1990). Zaradi tega so prilagoditve membranskih lipidov ena od pomembnih strategij preživetja za organizme v slanem okolju. Več o tem bo govora v enem od naslednjih poglavij.

2.1.2 Odziv organizmov na slanostni stres

Parametri okolja, v katerem se nahajajo mikroorganizmi, se pogosto hitro in občutno spreminjajo, zato je prilagajanje tem spremembam nujno za preživetje posameznika in s tem za ohranitev vrste. Zmožnost prilagajanja spremembam osmolarnosti okolja je ena temeljnih lastnosti živih bitij (Rep in sod., 2000).

Osmotski stres zaradi povečanja koncentracij raztopljenih soli v okolju sproži v celicah obsežne spremembe. Celice ekstremno halotolerantne alge *Dunaliella salina* se po prenosu

v gojišče z visoko koncentracijo NaCl zaradi hitre izgube vode močno skrčijo in se prenehajo deliti. Po dveh urah se v celicah nakopiči dovolj glicerola, da se vzpostavi prvotni volumen, ponovno pa se začnejo deliti šele deset ur po nastopu šoka. Na podlagi tega Azachi in sod. (2002) domnevajo, da se devet ur po šoku izražajo geni, udeleženi v odpornosti na slanost. Dinamika prvega odziva na povečanje koncentracije soli pa je precej zapletena. Analize genomskih DNA čipov za *Saccharomyces cerevisiae* kažejo, da je vzorec ekspresije genov pri tem organizmu odvisen od intenzitete in časa trajanja slanostnega šoka (Posas in sod., 2000). Od tod morda izvirajo nekatere razlike med rezultati različnih raziskav s tega področja. Preglednica 1 kaže, kolikšnemu številu genov se je spremenila ekspresija v različnih poskusih. Posas in sodelavci opažajo, da se številnim genom izražanje močno poveča pri manjšem stresu (tudi 10×), vendar le prehodno, medtem ko pri večjem stresu število aktiviranih genov s časom narašča. Yale in Bohnert (2001) ugotavljata, da se najprej odzovejo geni za metabolizem nukleotidov in aminokislin, ki jim sledijo geni za sintezo, modifikacije in znotrajcelični transport proteinov. Ves čas trajanja stresa (90 minut) so povečano prepisujejo geni, povezani s proizvodnjo energije. Po 90 minutah prevladuje izražanje genov, katerih produkti sodelujejo v detoksikaciji, izrabi energijskih rezerv in sintezi maščobnih kislin in lipidov. Za razliko od tega so Posas in sod. (2000) ter Rep in sod. (2000) najprej zaznali povečano prepisovanje genov za metabolizem ogljikovih hidratov (glavni odziv *S. cerevisiae* na osmotski stres je sinteza glicerola), kasneje pa še genov za ionsko homeostazo in signalno transdukcijo. Medtem, ko tako Yale in Bohnert (2001) kot Posas in sod. (2000) opažajo povečano izražanje genov, ki nosijo zapis za ribosomalne proteine, pa Rep in sod. (2000) zaznajo zmanjšanje njihovega izražanja, ki ga povežejo z začasnim zastojem rasti ob začetku stresa.

Glavnina genov, katerih izražanje se spremeni ob nastopu osmotskega stresa, je pod nadzorom signalne poti HOG (High Osmolarity Glycerol), ki zazna spremembe v osmolarnosti medija in preko kaskade signalnih proteinov sproži prepisovanje ustreznih genov (Posas in sod., 2000; Rep in sod., 2000).

Pregl. 1: Število genov, katerih izražanje se po izpostavljenosti slanostnemu stresu spremeni (Posas in sod., 2000; Yale in Bohnert, 2001; Rep in sod., 2000).

pogoji stresa, odziv genov	avtor		Posas in sod. (2000)		Yale in Bohnert (2001)			Rep in sod. (2000)
	koncentracija NaCl		0,4 M	0,8 M	1 M			0,7 M
čas trajanja stresa (min)	10	20	10	20	10	30	90	30*
št. genov s povečanim izražanjem	1359	172	392	735	107	243	354	186
št. genov z zmanjšanim izražanjem (določali le Rep in sod.)								>100

*predhodni poskusi avtorjev so 30 min po osmotskem šoku zaznali največji transkripcijski odziv, zato so v poskusu uporabili le ta čas trajanja stresa.

2.2 *Aureobasidium pullulans*

2.2.1 Taksonomska klasifikacija

Kraljestvo: *Fungi*

Deblo: *Ascomycota*

Razred: *Dothideomycetes*

Podrazred: *Dothideomycetidae*

Red: *Dothideales*

Družina: *Dothioraceae*

Rod: *Aureobasidium*

Vrsta: *A. pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918)

Varietete: *A. pullulans* var. *pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918), *A. pullulans* var. *melanogenum* Herm.-Nijh. (1977), *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova (1997), *A. pullulans* var. *lini* (Laff.) W.B. Cooke (1962)

2.2.2 Morfologija

Kolonije glive *A. pullulans*, ki na sladnem agarju v sedmih dneh dosežejo premer 4 cm, so gladke, kmalu prekrite s sluzno plastjo spor in so rumene, kremne, rožnate, rjave ali črne barve. Včasih se tvori zračni micelij, ki je redek in volnat. Hife imajo v premeru 2-16 μm , so prozorne in imajo gladke, tanke stene (Samson in sod., 2000). Končne - apikalne celice mladih hif so razvejane in imajo 10-100 jeder. Z neenakomerno septacijo kasneje nastanejo celice s 3-10 jedri, ki so pogosto bolj široke kot dolge (Takeo in de Hoog, 1991). Z nadaljnjim zorenjem kulture se lahko tem celicam stene odebelijo, hife pa postanejo temno rjave. Takšne hife pogosto razpadejo na posamezne celice (artrokonidije) ali pa služijo kot klamidospore. Pri nekaterih sevih se to zgodi že pri mladih kolonijah, ki se zaradi tega obarvajo olivno zeleno do rjavo; zanje je Hermanides-Nijhof (1977) predlagal varieteto *A. pullulans* var. *melanogenum*. Konidiogene celice niso diferencirane. Blastokonidiji nastajajo sinhrono v gostih skupinah na vmesnih (interkalarnih) ali končnih celicah hif ali pa na kratkih stranskih izrastkih. Kadar je sporulacija obilna, nastajajo po vsej celični površini. Konidiji so enocelični, prozorni, celična stena je gladka. So elipsoidni, neenakomerne oblike, pogosto imajo neizrazit hilum (brazgotino na mestu, kjer so bili pritrjeni). Njihova velikost ni enotna, sekundarni konidiji pa so praviloma manjši. Endokonidiji so redki in nastanejo, če se konidij z interkalarne celice sprosti v sosednjo prazno celico (Samson in sod., 2000).

Glede na morfologijo uvrščamo *A. pullulans* v skupino črnih kvasovk, ki jo sestavlja več filogenetsko heterogenih hifomicet. Skupna jim je temna obarvanost in začetni razvoj kolonije, ki zaradi obilnega brstenja konidijev spominja na rast kvasovk (Gams in Seifert, 2001).



Slika 1: Celice halotolerantne črne kvasovke *A. pullulans*

2.2.3 Habitat

A. pullulans je kozmopolitski saprofit. Ker je osmotoleranten, je pogost v rahlo osmotskih naravnih nišah, kot so filosfera (Zalar in sod., 1999) in površina sladkih sadežev (de Hoog in Yurlova, 1994). Kadar rastlina izloča sladek eksudat, se lahko *A. pullulans* tako namnoži, da na listih ustvari črno prevleko (Adams in Moss, 2000). Pogosto ga najdemo v živilih: na sadju in zelenjavi (Samson in sod., 2000; Webb in Mundt, 1978), žitih, sveže obranih oreških, sadnih napitkih in zamrznjenih sadnih pitah (Samson in sod., 2000), pa tudi v škampih in na dolgo skladiščenem govejem mesu, kjer je vključen v nastanek črnih madežev (Duraković S. in Duraković L., 2003). Izoliran je bil tudi iz slanega močvirja (Torzilli, 1997), morske vode (Chi in sod., 2007; Li in sod., 2007a, 2007b) in evaporacijskih bazenov solin (Gunde-Cimerman in sod., 2000), s površine blokov marmorja (Urzi in sod., 1999) in iz tal (Shiomi in sod., 2004). Poleg tega ga najdemo še v hišnem prahu (Kuhn in Ghannoum, 2003) in na vlažnih mestih v stanovanjih (kopalnice, okenski okvirji), pa tudi na človeški koži in nohtih (Samson in sod., 2000). Čeprav načeloma ni patogen za človeka, lahko povzroči oportunistične okužbe pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom (Sánchez in sod., 2006; Creger in sod., 1998; Salkin in sod., 1986) ali kot kontaminant pri operacijskih posegih ali poškodbah (Bolignano in Criseo, 2003). Znani so primeri glivnega peritonitisa pri bolnikih na peritonealni dializi (Pritchard in Muir, 1987). Povezujejo ga tudi z alergičnimi obolenji dihal (Taylor in sod., 2006; Stark in sod., 2005; Patovirta in sod., 2003). Panda in sod. (2006) pa so prepoznali *A. pullulans* kot povzročitelja keratitisa.

2.2.4 Gospodarski in tehnološki pomen

A. pullulans je vir številnih tehnološko zanimivih encimov in metabolitov. Proizvaja pululan, vodotopen polisaharid, široko uporaben v prehrambeni in farmacevtski industriji, pa tudi drugje, npr. v tisku in elektroniki (Singh in sod., 2008; Gupta M. in Gupta A.K., 2004; Kimoto in sod., 1997). Spekter encimov, ki jih lahko pridobivamo s pomočjo *A. pullulans*, med drugim zajema lipaze, amilaze, glukoamilaze, alkalne proteaze, ksilanaze in acidofilne ksilanaze (Liu in sod., 2008; Li in sod., 2007a, 2007b; Chi in sod., 2007; Christov in sod., 1999; Christov in Prior, 1997; Ohta in sod., 2001). Nekateri metaboliti so obetavni pri razvoju novih zdravil (Hyun Dong Shin in sod., 2007; Kimura in sod., 2006) ali pa delujejo preventivno kot prebiotiki (Lateef in sod., 2007; Yoshikawa in sod., 2007). Številne raziskave kažejo, da so pripravki s celicami *A. pullulans* učinkoviti pri zaščiti obranega sadja pred gnitjem (Mounir in sod., 2007; Sanae Krimi Bencheqroun in sod., 2007; Ippolito in sod., 2005; Schena in sod., 1999; Lima in sod., 1997) in preprečijo hrušev ožig na jablanah (Kunz, 2006), kar predstavlja zdravju in okolju prijazno alternativo kemičnim zaščitnim sredstvom. *A. pullulans* bi lahko bil uporaben tudi v bioremediaciji zakisanih tal, saj z bazičnimi izločki nevtralizira vpliv kislega dežja (Shiomi in sod., 2004).

2.2.5 *A. pullulans* v slanem okolju

A. pullulans je halotoleranten mikroorganizem, ki raste tudi še pri 17-odstotni koncentraciji NaCl (m/v) (Gunde-Cimerman in sod., 2000), najbolje pa vendarle v odsotnosti soli (Zalar in sod., 1999). V slanem okolju pride v celicah do nekaterih sprememb. Kot druge halotolerantne glive tudi *A. pullulans* kot glavni kompatibilni topljenec sintetizira glicerol, *A. pullulans*, izoliran iz solin, pa pri povišanih koncentracijah NaCl poveča tudi sintezo mikosporin-glutaminol-glikozida, ki se v gojišču brez soli ne sintetizira in morda služi kot dodatni kompatibilni topljenec (Kogej in sod., 2006). Koncentraciji Na⁺ in K⁺ ionov v citoplazmi ostajata razmeroma nizki (Kogej in sod., 2005).

Povišana slanost pri *A. pullulans* povzroči prilagoditve celičnih membran. Elektronska paramagnetna resonančna spektroskopija (EPR) je pokazala, da delež bolj fluidnih domen v membrani s slanostjo narašča. Razmerje sterolov proti fosfolipidom, ki pomembno vpliva na fluidnost membran, je v odsotnosti soli bolj podobno tistemu pri nehalotolerantni *S. cerevisiae* kakor pri ekstremno halotolerantnih črnih kvasovkah *Hortaea werneckii* in *P. triangularis*. Pri rasti v gojišču s 5 % in 10 % NaCl (m/v) pa se vrednost razmerja steroli:fosfolipidi pri *A. pullulans* približa vrednostima pri *H. werneckii* in *P. triangularis*, vendar ju ne doseže. Deleži fosfolipidov, med katerimi prevladujeta fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin, se pri različnih slanostih skoraj ne razlikujejo, opazne pa so razlike v sestavi maščobnih kislin. Glavne maščobne kisline v membranah *A. pullulans* so palmitinska kislina (C16:0), stearinska kislina (C18:0), oleinska kislina (*cis*-C18:1^{Δ9}), *cis*-12-oktadekanojska kislina (*cis*-C18:1^{Δ12}), linolna kislina (*cis*-C18:2^{Δ9,12}) in *trans*-9,12-oktadekanojska kislina (*trans*-C18:2^{Δ9,12}). Z naraščanjem količine soli v gojišču narašča delež *cis*-C18:2^{Δ9,12}, obenem pa padata deleža C18:0 in *cis*-C18:1^{Δ9} (Turk in sod., 2004). To nakazuje, da je pri *A. pullulans* uravnavanje (ne)nasičenosti maščobnih kislin pomemben dejavnik ohranjanja fluidnosti membran v slanem okolju.

2.3 CELIČNE MEMBRANE

Od delovanja celičnih membran so odvisne mnoge vitalne funkcije celice. Membrane organizirajo biološke procese tako, da jih ločijo v oddelke, s preprečevanjem prostega pretoka topljencev in z nadzorovanim prenosom določenih snovi (hranil, ionov, metabolnih produktov itd.) pa določajo sestavo citoplazme in medija znotraj oddelkov (Voet in Voet, 2004; Hazel in Williams, 1990). Poleg tega omogočajo shranjevanje energije v obliki transmembranskih koncentracijskih gradientov, nudijo ogrodje za organizacijo sestavnih delov kompleksnih metabolnih poti in sistemov za pridobivanje energije ter nadzirajo prenos informacij med oddelki znotraj celice ter med celico in okoljem. Osnovni gradniki celičnih membran so fosfolipidi, amfipatske molekule, ki v vodnem okolju agregirajo in spontano tvorijo dvosloje. Pri tem hidrofilni del molekul, v katerem je fosfat, ostane v stiku z vodo, hidrofobni maščobnokislinski repi pa se obrnejo v notranjost dvosloja. V osnovno mrežo iz fosfolipidov so vsidrani proteini, ki jih je v večini celic celo več kot lipidov. Strukturo dvosloja ohranjajo van der Waalsove vezi in hidrofobne interakcije, pri evkariontih pa ga dodatno stabilizirajo steroli, ki predstavljajo 5 do 25 odstotkov skupnih membranskih lipidov. Kljub temu dvosloj ni rigiden, temveč se obnaša kot dvodimenzionalna tekočina, v kateri se molekule prosto gibljejo v lateralnih smereh (Madigan in sod., 2000). Prav ta fluidnost je ključna za pravilno delovanje membran. Odvisna je od dolžine in nasičenosti maščobnih kislin v fosfolipidih (daljše in bolj nenasičene maščobne kisline povzročijo večjo fluidnost) in od vsebnosti sterolov, nanjo pa močno vplivajo tudi zunanji dejavniki - temperatura, pH, tlak, vodna aktivnost in prisotnost različnih ionov. Prav zaradi tega je za celice življenjskega pomena, da so sposobne prilagajati sestavo svojih membran dejavnikom okolja in s tem ohranjati njihovo optimalno fluidnost.

Encimi, vključeni v biosintezo membran, so v glavnem integralni membranski proteini. Pri prokariontih se fosfolipidi sintetizirajo na citoplazemski strani membrane, encimi flipaze in translokaze fosfolipidov pa jih prenesejo na zunanjo stran. V evkariontih se lipidi sintetizirajo na citoplazemski strani endoplazemskega retikuluma; od tam se prenesejo v druge membrane z brstenjem membranskih veziklov in njihovim zlivanjem s ciljnim membranami. Razlike v lipidni sestavi med različnimi membranami nastanejo s selektivnim transportom določenih lipidov s posebnimi proteini prenašalci (ang. *phospholipid exchange proteins*) (Voet in Voet, 2004).

2.3.1 Vpliv soli na membrane

Interakcije med membranskimi lipidi in vodo so bistven dejavnik membranske organiziranosti, zato ni presenetljivo, da sprememba a_w drastično spremeni strukturo membrane. Membranska fluidnost je neločljivo povezana s hidracijo fosfolipidov. Znano je, da so lipidi v tekoči fazi bolj hidrirani kot v gelski (Hazel in Williams, 1990). Velja tudi, da polarni lipidi z nenasičenimi acilnimi verigami bolj vežejo vodo kot tisti z nasičenimi in da heterogenost acilnih verig ter prisotnost holesterola in diacilglicerolov v

membrani povečajo hidracijo (Rand in Parsegian, 1989). Bolj, ko so glave fosfolipidov hidrirane, večji je razmik med njimi, s tem pa imajo acilne verige več prostora za gibanje (Hazel in Williams, 1990). Raztopljene soli v mediju, ki obdaja membrane, tekmujejo z glavami fosfolipidov za vodne molekule, kar zmanjša hidracijo in s tem fluidnost. Poleg tega ima večina membran velik delež anionskih lipidov, na katere se vežejo kationi iz obdajajoče raztopine. Predvsem vezava dvovalentnih kationov lahko precej dvigne temperaturo prehoda med trdno in tekočo fazo lipidov (T_m - melting temperature). Tako npr. T_m dimiristoilfosfatidilserina z 39 °C v prisotnosti Na^+ zraste na 98 °C ob vezavi Mg^{2+} in na kar 155 °C ob vezavi Ca^{2+} . Vendar pa vezava nekaterih ionov tudi zniža T_m , vpliv vezave pa je odvisen tudi od njene moči, ki je spet odvisna tako od vrste iona kot od vrste fosfolipida in nenasičenosti acilnih verig (Hazel in Williams, 1990). Težko je torej potegniti splošen zaključek o tem, na kakšen način vezava ionov vpliva na fluidnost membran.

2.3.2 Značilnosti celičnih membran pri organizmih, ki rastejo v slanem okolju

Ker povišane koncentracije soli močno vplivajo na biološke membrane, se morajo organizmi, ki živijo v slanih okoljih, le-tim prilagoditi tudi na nivoju lipidne sestave membran.

Več membranskih funkcij pri zmerno halofilnih bakterijah je odvisno od prisotnosti Na^+ in vse halobakterije imajo visok delež negativno nabitih lipidov v membrani. Sicer pa sestava celičnih membran ni samo genotipska lastnost, ampak je odvisna od trenutnih razmer v okolju. Pri visoki slanosti gojišča se pri bakterijah poveča delež anionskih lipidov (Russel, 1989). Isti avtor navaja, da se pri po Gramu pozitivnih bakterijah poveča tudi vsebnost nenasičenih in ciklopropanskih maščobnih kislin, Valderrama in sod. (1998) pa so za zmerno halofilno po Gramu negativno bakterijo *Halomonas salina* ugotovili, da vsebnost nasičenih in ciklopropanskih acilnih verig s slanostjo narašča, vsebnost enkrat nenasičenih pa pada.

Membranski lipidi črne kvasovke *H. werneckii* med rastjo v gojišču z visokimi koncentracijami soli vsebujejo več nenasičenih maščobnih kislin, pri vrsti *P. triangularis* pa je njihova vsebnost nekoliko manjša kot v celicah, ki so rasle pri nižjih koncentracijah soli (Turk in sod., 2004). Kvasovke se med seboj razlikujejo tudi v razmerju steroli:fosfolipidi. Le-to narašča od ekstremno halotolerantnih *H. werneckii* in *P. triangularis* preko halotolerantnega *A. pullulans* do nehalotolerantne *S. cerevisiae* (Turk in sod., 2004). Obe ekstremno halotolerantni vrsti pri vseh raziskovanih slanostih ohranjata večjo fluidnost membran kot halotolerantna in na sol občutljiva pivska kvasovka. Podobno so Turk in sod. (2007) tudi pri halotolerantni kvasovki *Debaryomyces hansenii* izmerili manjše razmerje sterolov proti fosfolipidom kot pri *S. cerevisiae* in povečano nenasičenost maščobnih kislin pri visokih koncentracijah NaCl, kar pa ni bistveno vplivalo na fluidnost membran.

Včasih je povečana nasičenost acilnih verig in s tem manjša fluidnost membran lahko tudi prednost. Yoshikawa in sod. (1995) ter Xu in Beardall (1997) so takšen odziv v slanem okolju opazili pri halotolerantni kvasovki *Zygosaccharomyces rouxii* in algi rodu *Dunaliella* ter postavili domnevo, da s tem preprečita iztekanje glicerola in vstopanje Na⁺ ionov v celice.

2.3.3 Odziv membran na slanostni stres

Ker je plazemska membrana v neposrednem stiku z okoljem, lahko zazna in se tudi odzove na spremembe v njejovi slanosti. Pri osmotskem šoku se celica skrči, kar v membrani povzroči lateralne pritiske. Russel (1989) je predlagal mehanizem, po katerem pri bakterijah takšni pritiski aktivirajo encime za sintezo fosfolipidov, ki so vsidrani v plazemsko membrano. Tamás in sod. (2000) so ugotovili, da je pri *S. cerevisiae* aktivacija HOG signalne poti odvisna od senzorjev, ki zaznajo spremembe v turgorju celice. Do hitrih, skorajda hipnih sprememb pa ne pride le v plazemski membrani. Pri *D. salina* endoplazemski retikulum služi kot rezervoar za membrano. Ko se ob hiperosmotskem stresu celica skrči, se v njem skladišči odvečen membranski material, ob hipoosmotskem šoku pa deluje kot donor materiala, potrebnega za širjenje celice zaradi naglega vdiranja vode skozi plazemsko membrano (Hazel in Williams, 1990).

2.4 MAŠČOBNE KISLINE

Maščobne kisline so dolgoverižne karboksilne kisline. V naravi jih redko najdemo kot proste molekule, večinoma so vezane z estrsko vezjo v različnih lipidih in predstavljajo enega osnovnih gradnikov vsake celice. Njihova struktura močno vpliva na lastnosti molekule, v katero so vezane. Večina maščobnih kislin ima med 14 in 20 C atomov. Pri nasičenih maščobnih kislinah z naraščanjem njihove dolžine narašča tudi T_m. V molekulah z eno ali več dvojnimi vezmi, ki imajo praviloma *cis* konfiguracijo, je oteženo vzpostavljanje van der Waalsovih interakcij med sosednjimi verigami, zato nenasičenost poveča fluidnost lipidov (Voet in Voet, 2004). Na fizikalne in s tem tudi fiziološke lastnosti maščobnih kislin močno vplivata število in mesto dvojnih vezi v verigi (Shanklin in Cahoon, 1998). Že vnos ene same dvojne vezi npr. zmanjša T_m dipalmitoil-fosfatidilholina za kar 46 °C (Schneiter in sod., 2000). V nasprotju z evkarionti imajo maščobne kisline bakterij redko več kot eno dvojno vez v molekuli. Namesto s stopnjo nenasičenosti maščobnokislinskih ostankov fluidnost uravnavajo z njihovo razvejanostjo, hidroksilacijo ali prisotnostjo ciklopropanskih obročev v verigi (Voet in Voet, 2004).

Dvojna vez se pogosto pojavlja med devetim in desetim C atomom, šteto od karboksilnega konca. Takšno vez označimo kot Δ⁹ dvojno vez. Pri večkrat nenasičenih maščobnih kislinah si dvojne vezi sledijo na vsakem tretjem atomu v smeri proti metilnemu koncu molekule (Voet in Voet, 2004).

2.4.1 Metabolizem maščobnih kislin

2.4.1.1 Sinteza maščobnih kislin

Pri kvasovkah poteka biosinteza maščobnih kislin v citosolu s kondenzacijo C_2 enot na maščobnokislinski sintazi - multifunkcionalnem encimu iz dveh heksamernih podenot ($\alpha_6\beta_6$). Ta 2500 kD velik encim je verjetno nastal z združitvijo večih prej neodvisnih encimov (Voet in Voet, 2004; Los in Murata, 1998). Biosinteza maščobnih kislin se začne tako, da se acilna skupina iz acetil-koencima A (acetil-CoA) prenese na proteinski prenašalec acilne skupine (ACP, acyl carrier protein) in od tam na maščobnokislinsko sintazo. Drugi acetil-CoA se najprej karboksilira v malonil-CoA; malonilna skupina se nato s CoA prenese na ACP in se ob dekarboksilaciji veže z acilno skupino na sintazi. Pri tem se rastoča veriga spet prenese na ACP. Sledi več redukcij in dehidracija, nakar je nova, za dva C atoma podaljšana veriga pripravljena na novo pripojitev dveh C atomov, ki ju spet prispeva malonil-CoA. To se ponavlja, dokler veriga ne doseže ustrezne dolžine (Voet in Voet, 2004). Glavnina *de novo* sintetiziranih maščobnih kislin pri *S. cerevisiae* ima nasičene in enkrat nenasičene verige s 16 in 18 C atomi, 1-2 % pa predstavljajo zelo dolge verige z 20 do 30 C atomi; med njimi prevladujejo C26:0 (Trotter, 2001; Wongsumpanchai in sod., 2004).

2.4.1.2 Razgradnja maščobnih kislin

Maščobne kisline se razgrajujejo z β -oksidacijo, pri čemer se z maščobnokislinske verige odcepita dva ogljikova atoma naenkrat. Maščobna kislina se najprej aktivira s Co-A, ki se preko estrske vezi veže na karboksilni konec. Sledi dehidrogenacija, pri kateri pride do nastanka dvojne vezi med drugim in tretjim C atomom. Ta vez se nato hidratira, nastala alkoholna skupina se oksidira v ketonsko, z vezavo nove molekule CoA pa se acilna veriga razcepi na acetil-CoA in acil-CoA, ki je od prvotnega krajši za dva C atoma (Voet in Voet, 2004; Madigan in sod., 2000).

Razgradnja maščobnih kislin pri *S. cerevisiae* v nasprotju z višjimi evkarionti poteka v peroksisomih, ne pa tudi v mitohondrijih. Peroksisomi morajo poleg osnovnih encimov, potrebnih za β -oksidacijo, vsebovati še sisteme za reoksidacijo NADH in redukcijo $NADP^+$ (oba nastajata med β -oksidacijo), privzem maščobnih kislin iz citosola in izvoz enot acetil-CoA iz peroksisoma v mitohondrij, kjer se popolnoma oksidirajo do CO_2 in H_2O (Roermund in sod., 2003).

2.4.1.3 Privzem maščobnih kislin iz okolja

Celica lahko maščobne kisline privzame tudi iz okolja. Mehanizem prehoda skozi plazemsko membrano še ni pojasnjen, v vsakem primeru pa se morajo take molekule pred vstopom v katabolne reakcije najprej aktivirati z encimom acil-CoA sintetazo, ki katalizira vezavo maščobne kisline na koencim A (Trotter, 2001). Schneiter in sod. (2000) so odkrili,

da vrsta maščobnih kislin v okolju (predvsem njihova dolžina) močno vpliva na to, katera vrsta fosfolipidov bo prevladovala v celičnih membranah, na sestavo acilnih verig v posameznih razredih fosfolipidov pa ne vpliva.

2.4.1.4 Uravnavanje lipidnega metabolizma

Videli smo že, da celice prilagodijo sestavo svojih membran razmeram v okolju. To kaže, da okoljski dejavniki vplivajo na lipidni metabolizem tako, da privede do lipidne sestave, ki ustreza trenutnim okoliščinam. Spremembe membran so dveh vrst: hitre, ki se ponavadi ne ohranijo, a omogočijo preživetje ob šoku zaradi spremenjenih razmer v okolju, in počasne, ki se uveljavijo z zamikom, nato pa se ohranijo, dokler trajajo nove razmere (Hazel in Williams, 1990).

Spremembe v lipidni sestavi so lahko posledica sprememb v lipidni biosintezi ali pa selektivne razgradnje določenih lipidov. Poti lipidnega metabolizma, ki vodijo v prestrukturiranje membran, lahko razdelimo v tri skupine: (a) reakcije metabolizma maščobnih kislin in acil-CoA, ki vključujejo sintezo *de novo*, desaturacijo, elongacijo in krajšanje maščobnokislinskih verig; (b) reakcije *de novo* sinteze celotnih fosfolipidov, ki določajo tako zgradbo acilnih verig kot vrsto glave fosfolipida; (c) reakcije modificiranja in razgradnje fosfolipidov (Hazel in Williams, 1990).

(a) Vse maščobne kisline - tako tiste, sintetizirane *de novo*, kot pridobljene iz prehranskega vira - morajo vstopiti v acil-CoA rezervoar, preden se vgradijo v celične lipide. Medtem, ko dodatek maščobnih kislin v gojišče spremeni sestavo tega rezervoarja (Schneiter in sod., 2000), pa je le-ta precej neodvisen od fizikalnih vplivov okolja. Pri adaptaciji na nižje temperature se večja vgradnja nenasičenih maščobnih kislin v kompleksne lipide uravnoteži z njihovo povečano sintezo, sestava acilnega rezervoarja pa se zaradi večjega pretoka maščobnih kislin skozenj bistveno ne spremeni. Ker lahko encimi lipidnega metabolizma razbirajo med različnimi substrati (dolžina verige, stopnja nenasičenosti), je morda selektivna vgradnja nenasičenih maščobnih kislin enako pomemben predmet nadzora membranske sestave pri hladnem stresu, kot je to njihova povečana sinteza (Hazel in Williams, 1990).

(b) Dejavniki okolja lahko vplivajo tako na hitrost biosinteze membranskih lipidov kot na vrsto novonastalih lipidov. Omenili smo že, da se pri bakterijah v slanem okolju spremeni tudi vrsta fosfolipidov, ne le njihove acilne verige. Pri *Pseudomonas halosaccharolytica* in *Vibrio costicola* se pri visoki slanosti močno zmanjša hitrost sinteze fosfatidil etanolamina, medtem ko hitrost sinteze fosfatidil glicerola ostaja približno enaka (Russel, 1989). Podobno se zgodi tudi pri dodatku saharoze v gojišče, kar kaže, da gre pri tem za vpliv osmotskega stresa in ne ionov kot takih (Hazel in Williams, 1990).

(c) Najhitrejši in energetsko najugodnejši način prestrukturiranja membran je preoblikovanje že obstoječih fosfolipidov. Obstajata dva mehanizma: (i) Dopolnjujoče

delovanje fosfolipaze in lizofosfolipid aciltransferaze poskrbi za zamenjavo ene ali obeh acilnih verig v molekuli fosfolipida. Od fosfolipaze, ki katalizira prvi korak - odcepitev acilne verige, je odvisna hitrost cikla deacilacije/reacilacije. Pri nizkih temperaturah, kjer je *de novo* sinteza fosfolipidov močno upočasnjena, je nasprotno aktivnost fosfolipaze povečana. Raziskave kažejo, da zaznava stanje fluidnosti membrane. Substratna specifičnost obeh encimov pa je odvisna od temperature. (ii) Z ustreznimi encimi se lahko modificirajo acilne verige neposredno na fosfolipidu. Pri filamentozni cianobakteriji *Anabaena variabilis* se pri padcu temperature naglo poveča delež monoglikozil digliceridov z enkrat nenasičenimi C16 verigami; to lahko preprečimo z dodatkom kloramfenikola, kar kaže, da je za desaturacijo odgovorna indukcija sinteze desaturaz. V kolikšni meri ta mehanizem prispeva k adaptaciji na okolje, je odvisno od vrste. Pri migetalkarju *Tetrahymena* se neposredna desaturacija fosfatidilholina ob znižanju temperature poveča štirikrat, pri kvasovki *Candida* pa sprememb ni zaznati (Hazel in Williams, 1990).

2.4.2 Desaturacija maščobnih kislin

Nenasičene maščobne kisline so bistvena sestavina membran in založnih lipidov. V membranskih glicerolipidih predstavljajo glavnino acilnih verig. Njihova dolžina sega od 14 do 26 C atomov, v posamezni molekuli pa je lahko ena do šest dvojnih vezi. Kvasovki *S. cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe* sta pri tem nekoliko neobičajni, saj imata le enkrat nenasičene maščobne kisline (Martin in sod., 2007).

Desaturacija maščobnih kislin je encimska reakcija, pri kateri se v acilno verigo uvede dvojnica. Pri evkariontih se ob tem kisikova molekula reducira do vode, nekateri prokarionti pa lahko reakcijo izvršijo tudi brez prisotnosti kisika. Na začetku evolucije je desaturacija verjetno potekala anaerobno; ta reakcija tudi porabi manj energije. Z nastankom kisikove atmosfere pa se je uveljavil drugi način, saj da dihanje s kisikom toliko več energije, da malo bolj energetsko zahtevna reakcija ne predstavlja težave (Shanklin in Cahoon, 1998).

Večina ektotermnih organizmov se na nižje temperature okolja prilagodi s povečanjem števila dvojnih vezi v acilnih verigah membranskih lipidov, s čimer ohranijo optimalno fluidnost membran. Pri glivah se pri tem bolj kot skupno število nenasičenih maščobnih kislin poveča delež večkrat nenasičenih verig. Na primer, pri prenosu *Neurospora crassa* s 37 °C na 15 °C se delež nenasičenih maščobnih kislin poviša le z 82 % na 87 %, število dvojnih vezi / 100 acilnih verig pa naraste s 142 na 200 (Martin in sod., 2007).

2.4.2.1 Struktura in delovanje desaturaz

Poznamo dva evolucijsko nepovezana razreda desaturaz: topne in membransko vezane. Slednje so v živem svetu veliko bolj razširjene. Pred desaturacijo se maščobna kislina

esterificira na ACP (v primeru topnih desaturaz) ali na CoA ali lipidu (če bodo reakcijo izvršile integralske membranske desaturaze) (Shanklin in Cahoon, 1998).

Glede na vrsto substrata lahko desaturaze razvrstimo v tri razrede: (a) acil-lipid desaturaze so značilne za cianobakterije in rastline, našli pa so jih tudi v protozoju *Acanthamoeba* in v *Caenorhabditis elegans*; (b) acil-ACP desaturaze so v stromi kloroplastov v rastlinskih celicah; (c) acil-CoA desaturaze so v celicah živali, kvasovk in gliv (Los in Murata, 1998).

Acil-CoA desaturaze so hidrofobni, 300-350 aminokislinski dolgi proteini, ki verjetno štirikrat prehajajo membrano. Elektrone dobijo od citokroma b_5 , ki jih dobi od citokrom b_5 reduktaze, ta pa od NADH. Opisane so bile acil-CoA desaturaze, ki v maščobnokislinsko verigo vnašajo dvojne vezi na mestih Δ^5 , Δ^6 , Δ^9 in Δ^{12} . Najbolj raziskane so stearoil-CoA desaturaze, katerih geni so bili klonirani iz več kot desetih vrst organizmov. Vse desaturaze iz te skupine imajo tri ohranjene regije s histidinskimi ostanki, ki verjetno služijo kot ligandi za feri ion v katalitičnem centru (Los in Murata, 1998). Histidinske regije so nameščene v enakih razdaljah glede na pričakovane transmembranske regije in to tako, da se pri pravilni zvitosti proteina znajdejo na isti strani membrane kot citokrom b_5 (Shanklin in Cahoon, 1998). Najbolje je proučena Δ^9 stearoil-CoA desaturaza pri *S. cerevisiae*, imenovana Ole1. Ole1 je himeren protein iz 510 aminokislinskih ostankov, katerega karboksilni del je homologen citokromu b_5 . Ta del molekule sprejme elektrone, ki jih iz NADH pripelje citokrom b_5 reduktaza, in jih prenese na katalitični center encima (Martin in sod., 2007).

Desaturaze katalizirajo nastanek dvojne vezi vedno na istem mestu v verigi. Če uvedejo dvojno vez za x -tim atomom, jih šteto s karboksilnega konca uvrščamo med Δ^x -desaturaze, z metilnega konca pa med ω^x -desaturaze. Poznamo pa tudi desaturaze, ki tvorijo dvojno vez za tretjim ogljikovim atomom, šteto od že obstoječe dvojne vezi proti metilnemu koncu molekule (Shanklin in Cahoon, 1998).

Desaturaze prepoznajo tudi dolžino maščobnokislinske molekule, vendar specifičnost prepoznavne dolžine verige ni enako močna pri vseh desaturazah. Pri rastlinah je npr. Δ^9 stearoil-ACP desaturaza 100× bolj aktivna na maščobnih kislinah z 18 C atomi kot na tistih s 16 C atomi, pri kvasovkah in podganah pa je aktivnost Δ^9 stearoil-CoA desaturaze na verigah obeh dolžin skoraj enaka (Shanklin in Cahoon, 1998).

2.4.2.2 Nadzor delovanja desaturaz

Ker je uravnavanje nasičenosti maščobnih verig v lipidih tako pomemben dejavnik prilagajanja organizmov na razmere v okolju, mora biti delovanje desaturaz dobro uravnano. Za *S. cerevisiae* je znano, da dodatek nasičenih maščobnih kislin v gojišče poveča aktivnost desaturaz, dodatek nenasičenih pa zmanjša. Dokazali so, da gre pri tem pravzaprav za nadzor na ravni izražanja desaturaznih genov. Pri cianobakterijah se poveča delež nenasičenih maščobnih kislin v membranah ob znižanju temperature. Predlaganih je

bilo več modelov: aktivacija desaturaz v membranah z nizkimi temperaturami (oz. z zmanjšano fluidnostjo membran v teh pogojih), zmanjšana sinteza nasičenih maščobnih kislin ob nespremenjeni aktivnosti desaturaz in povečana *de novo* sinteza desaturaz. Zadnji model podpira dejstvo, da ob dodatku rifampicina in kloramfenikola, ki inhibirata transkripcijo in translacijo, do desaturacije membranskih lipidov ne pride (Los in Murata, 1998).

Pri *S. cerevisiae* je nadzor delovanja desaturaze Ole1 bolj zapleten. Kontrolo izražanja njenega gena *OLE1* posredujeta proteina Spt23 in Mga2, vsidrana v membrani endoplazemskega retikuluma. N-terminalna fragmenta teh proteinov se sprostita s proteolizo, ki jo posreduje ubikvitin-proteasomski sistem, in se preneseta v jedro, kjer delujeta kot koaktivatorja transkripcije *OLE1*. *OLE1* ima dva promotorska elementa: FAR (fatty acid response element) in LORE (low oxygen response element). LORE leži za FAR in v hipoksičnih razmerah drastično poveča izražanje, ki ga je sprožil FAR, kar ublaži učinek zmanjšane dostopnosti O₂ za desaturazo. Kadar so v gojišču nenasičene maščobne kisline, te zavrejo dejavnost obeh promotorskih elementov in obenem tudi skrajšajo razpolovni čas *OLE1* mRNA z 10-12 minut na manj kot dve minuti. Poleg tega predvsem kratkoverižne in večkrat nenasičene maščobne kisline preprečijo proteolitsko procesiranje Spt23, medtem ko na procesiranje Mga2 ne vplivajo; ta protein uravnavajo drugi mehanizmi (Martin in sod., 2007; Martin in sod., 2002).

Na transkripcijo gena *OLE1* vpliva tudi hiperslani stres, ob povečanju slanosti se količina *OLE1* mRNA več kot štirikrat zmanjša (Rep in sod., 2000).

Pri ekstremno halotolerantni črni kvasovki *H. werneckii* sta znani dve desaturazi. Gena za vsako od njiju sta v genomu *H. werneckii* prisotna v vsaj dveh kopijah. *HwOLE1A* in *HwOLE1B* kodirata Δ^9 -desaturazo, *HwODE12A* in *HwODE12B* pa Δ^{12} -desaturazo. Transkripcija obeh parov genov je najmanjša, kadar celice rastejo pri 5 do 13-odstotni slanosti, kar je optimalno območje za ta organizem, in največja pri 17 % NaCl (m/v). Ob slanostnem stresu se transkripcija obeh genov zmanjša, nato pa postopno naraste na raven, kakršna je bila izmerjena v celicah, ki so stalno rasle pri odgovarjajoči slanosti (Gostinčar, 2004).

2.4.3 Elongacija maščobnih kislin

Lipidna sestava celic je glede na dolžino acilnih verig zelo preprosta in sestoji večinoma iz maščobnih kislin s 16 ali 18 C atomi. Zelo dolge maščobne kisline s 24 in 26 C atomi predstavljajo sicer le majhen delež (1-5 %) vseh maščobnih kislin, so pa pomembne kot sestavni del ceramida, ki ga najdemo v sfingolipidih, in glikozilfosfatidilinozitolnega sidra, s katerim so nekateri proteini zasidrani v membrano (Schneider in sod., 2000). Zelo dolge maščobne kisline v teh molekulah imajo verjetno posebno strukturno funkcijo. Pred kratkim odkrit fosfatidilinozitol z maščobno kislino s 26 C atomi v jedrni membrani je morda dokaz, da zelo dolge acilne verige pomembno sooblikujejo pore v jedrni membrani

(Tehlivets in sod., 2007). Maščobne kisline z dolgimi in zelo dolgimi verigami nastanejo s podaljševanjem maščobnih kislin, ki jih sintetizira sintaza maščobnih kislin. Proces opravljajo posebni encimi - elongaze, ki dodajajo C₂ enote na že obstoječe maščobne kisline.

2.4.3.1 Struktura in delovanje elongaz

Elongacija maščobnih kislin poteka v endoplazemskem retikulumu. Podobno kot *de novo* sinteza maščobnih kislin sestoji iz štirih zaporednih encimskih reakcij, od katerih vsako katalizira drug encim: kondenzacijski encim, β -keto-reduktaza, dehidraza in enoil reduktaza (Prasitchoke in sod., 2007; Tehlivets in sod., 2007). Prvi korak je verjetno odgovoren za hitrost in specifičnost vsake elongacijske reakcije. Geni, ki kodirajo encime kondenzacije v elongaciji maščobnih kislin, so razvrščeni v dve genetsko različni skupini: *KCS/FAE* pri rastlinah in *ELO* pri sesalcih in glivah (Prasitchoke in sod., 2007).

Pri *S. cerevisiae* poznamo tri vrste elongaz. Elo1 katalizira podaljšanje nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin s 14 in 16 C atomi, Elo2 in Elo3 pa sta udeleženi v sintezi maščobnih kislin z zelo dolgimi verigami. Pri tem Elo2 podaljša verige maščobnih kislin C16 in C18 do maščobnih kislin s 24 C atomi, Elo3 pa podaljša maščobne kisline C24 v C26. Odsotnost enega od obeh genov zmanjša vsebnost sfingolipidov v celicah, odsotnost obeh pa je letalna (Trotter, 2001; Prasitchoke in sod., 2007).

Tudi elongaze imajo podobna značilna histidinska zaporedja, kot smo jih omenili pri desaturazah. Encimi vsebujejo pet izrazito hidrofobnih domen, ki verjetno prečkajo lipidno membrano. To velja za elongaze živali in gliv, ne pa tudi rastlin. Druga razlika med skupinama elongaz je način aktivacije maščobnih kislin, podobno kot desaturaze tudi elongaze pri rastlinah kot substrat uporabljajo acil-ACP, pri živalih in verjetno tudi glivah pa acil-CoA (Inagaki in sod. 2002).

2.4.3.2 Nadzor delovanja elongaz

Pri halofilni algi *D. salina* visoka slanost poveča izražanje gena za encim, homologen β -ketoacil sintazam (Kcs) v rastlinah. Kcs katalizirajo kondenzacijo malonil-CoA z acil-CoA. Celice *D. salina*, ki so rasle v 3,5 M NaCl, imajo v mikrosomskih membranah več stearinske in oleinske kisline (C18:0 in C18:1 ^{Δ^9}) in manj palmitinske kisline (C16:0) kot celice, ki so rasle v 0,5 M NaCl. Poleg tega imajo tudi nekaj maščobnih kislin z 20 in 22 C atomi, ki jih pri mikrosomih iz celic, ki so rasle v 0,5 M NaCl, ni zaznati. Po drugi strani med plazemskimi membranami enih in drugih celic praktično ni razlik v lipidni sestavi. Izgleda, da skupaj z desaturazami elongaze v *D. salina* prilagodijo znotrajcelične membranske sisteme, da lažje funkcionirajo pri visokih koncentracijah glicerola v celicah, čeprav naj le-ta ne bi vplival na membrane. Ker je brstenje in zlivanje znotrajceličnih veziklov odvisno od specifičnih interakcij membrana-protein in membrana-membrana, so morda nekatere od teh interakcij zaradi visokih koncentracij glicerola vendarle ovirane.

Poleg tega pa naj bi elongaza skrbela tudi za substrat celičnim desaturazam, saj je celični rezervoar maščobnih kislin z 18 C atomi sestavljen pretežno iz nenasičenih molekul. Tako povečanje slanosti poveča desaturacijo tudi posredno preko aktivacije elongaz (Azachi in sod., 2002).

Gostinčar (2004) poroča o dveh izogenih za elongazo (*HwELO1A* in *HwELO1B*), identificiranih v genomu *H. werneckii*. Podobno kot izogena za desaturazi se tudi izogena za elongazo najmanj prepisujeta v območju ravnega optimuma tega organizma (med 5 in 13 % NaCl (m/v)) in najbolj pri 17 % soli (m/v). Ob slanostnem stresu se transkripcija obeh izogenov zmanjša, vendar v primeru hiperosmotskega stresa postopno naraste nazaj do takšne ravni, kot je bila v celicah, ki so stalno rasle pri slanosti, kakršna je bila vzpostavljena s stresom.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MIKROORGANIZMI IN POGOJI RASTI

3.1.1 Gliva

3.1.1.1 Sev

Halotolerantna črna kvasovka *Aureobasidium pullulans* je bila izolirana iz Sečoveljskih solin. Sev je shranjen v zbirki Genska banka Ex na Katedri za biologijo organizmov (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani) in v Mikrobiološki zbirki Kemijskega Inštituta v Ljubljani pod oznakama EXF-150 oz. MZKI B-802.

3.1.1.2 Gojišče

Sintetsko definirano gojišče YNB (Yeast Nitrogen Base)

- YNB (Yeast Nitrogen Base, BIO 101, Qbiogene)	1,7 g
- CSM (Complete Supplement Mixture, BIO 101, Qbiogene)	0,8 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck)	5,0 g
- glukoza (Kemika)	20,0 g
- NaCl (Merck); različne koncentracije (0 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 13 %; m/v)	
- destilirana voda	do 1000 ml

pH smo uravnali z 2M NaOH (Zorka Šabac) na pH 7 in avtoklavirali 15 min pri 121 °C in 1,2 atm.

Za trdno gojišče smo dodali 20 g agarja (Biolife) na 1 liter tekočega gojišča YNB.

Za shranjevanje glive smo gojišču brez soli dodali 87-odstotni glicerol do končne koncentracije 50 %.

Za slanostni stres smo gojišču uravnali pH z 1M HCl.

3.1.1.3 Gojenje

Iz zamrznjene založne kulture smo glivo nacepili na trdna gojišča YNB z različnimi koncentracijami soli in jo inkubirali pri 27 °C do pojava kolonij. Za predkulturo smo cepili po eno kolonijo s plošče v tekoča gojišča YNB, in sicer: s plošče brez dodane soli smo cepili v gojišče brez soli in v gojišče z 2,5 % NaCl (m/v), s plošče s 5 % NaCl (m/v) v gojišči s 5 % NaCl (m/v) in 7,5 % NaCl (m/v), in s plošče z 10 % NaCl (m/v) v gojišči z 10 % NaCl (m/v) in 13 % NaCl. Tako nacepljena gojišča smo inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 27 °C in 180 vrtljajih na minuto, dokler ni kultura dosegla primerne števila celic, ki smo ga določili z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 600 nm ($\text{OD}_{600} > 2$). Po 0,5 ml predkulture smo nacepili v 150 ml tekočega gojišča YNB z odgovarjajočo koncentracijo soli in inkubirali enako kot prej (27 °C, 180 rpm). Celice smo poželi v eksponencialni fazi rasti ($\text{OD}_{600} = 0,8 - 1$) s centrifugiranjem v sterilnih pollitrskih

centrifugirkah (Beckman), resuspendiranjem v manjši količini supernatanta in ponovnim centrifugiranjem v sterilnih 50-mililitrskih centrifugirkah (Falcon), oboje 10 minut pri sobni temperaturi in 5000 vrtljajih na minuto. Nato smo jih zamrznili v tekočem dušiku in jih do nadaljnje obdelave shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za slanostni stres smo po 1,5 ml predkulture nacepili v 500 ml tekočega gojišča YNB in inkubirali enako kot prej. Za hiperosmotski stres smo celice gojili v gojišču YNB brez dodane soli, za hipoosmotski stres pa v gojišču YNB z 10 % NaCl (m/v). Ko je kultura dosegla ustrežno optično gostoto ($\text{OD}_{600} = 0,8 - 1$; celice so v eksponencialni fazi rasti), smo odvzeli 80 ml gojišča in celice od njega ločili s filtriranjem skozi filter s premerom por $1,2\ \mu\text{m}$. Preostale celice smo poželi s centrifugiranjem pri sobni temperaturi in 5000 rpm in jih nato resuspendirali v 420 ml tekočega gojišča YNB z ustrežno slanostjo (10 % NaCl (m/v) za hiperosmotski stres in gojišče brez soli za hipoosmotski stres), ki smo ga pred tem ogreli na $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ in uravnali pH tako, da se je skladal s pH izrabljenega gojišča. Celice so bile izpostavljene slanostnemu stresu za 5 min, 10 min, 30 min, 60 min in 120 min ob stresanju in nespremenjeni temperaturi. Po preteku ustreznega časa smo odvzeli 80 ml kulture, celice od gojišča ločili s filtriranjem, jih zamrznili v tekočem dušiku ter shranili do nadaljnje obdelave pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Bakterija

3.1.2.1 Sev

Za kloniranje dela gena za elongazo smo uporabili kompetentne celice *Escherichia coli*, sev JM109, priložene kompletu »pGEM[®]-T Vector System« (Promega).

3.1.2.2 Gojišča

Gojišče SOC

- Tryptone (Biolife)	20 g
- Bacto-yeast extract (Difco)	5 g
- NaCl (Merck)	0,58 g
- KCl (Merck)	0,186 g
- glukoza (Kemika)	3,6 g
- destilirana voda	do 1000 ml

pH smo uravnali z 2M NaOH na pH 7, avtoklavirali 15 min pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1,2 atm in po avtoklaviranju dodali:

- sterilna založna raztopina Mg^{2+}	10 ml
---	-------

Založna raztopina Mg^{2+}

- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,033 g
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,465 g
- destilirana voda	do 10 ml

Sterilizirali smo jo s filtriranjem.

Gojišče LB (Luria-Bertani) z ampicilinom

- Tryptone (Biolife) 10 g
- Bacto-yeast extract (Difco) 5 g
- NaCl (Merck) 5 g
- destilirana voda do 1000 ml

pH smo uravnali z 2M NaOH na pH 7, avtoklavirali 15 min pri 121 °C in 1,2 atm in po avtoklaviranju dodali:

- ampicilin (100 mg/ml; Sigma) 1 ml

Za pripravo trdnih gojišč LB smo dodali 20 g agarja (Biolife) na 1 l tekočega gojišča.

Gojišče za modro-belo selekcijo:

- Tryptone (Biolife) 10 g
- Bacto-yeast extract (Difco) 5 g
- NaCl (Merck) 5 g
- agar (Biolife) 15 g
- destilirana voda do 1000 ml

pH smo uravnali z 2M NaOH na pH 7, avtoklavirali 15 min pri 121 °C in 1,2 atm in po avtoklaviranju dodali:

- ampicilin (100 mg/ml; Sigma) 1 ml
- X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-D-galaktopiranozid; Sigma) 80 µg
- 0,5 mM IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktozid; Sigma) 200 µl

3.1.2.3 Gojenje

E. coli smo gojili na trdnih gojiščih pri temperaturi 37 °C do pojava kolonij ali v tekočem gojišču na rotacijskem stresalniku pri 200 vrtljajih na minuto in temperaturi 37 °C preko noči.

3.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNA *A. pullulans*

Genomsko DNA smo izolirali iz celic *A. pullulans* po prirejenem protokolu, ki je bil razvit za izolacijo genomske DNA iz gliv vrst *Cochliobolus lunatus* in *Curvularia lunata* (Rozman in Komel, 1994). Reagente smo pripravili z MilliQ vodo in jih sterilizirali z avtoklaviranjem ali filtracijo.

- o Ekstrakcijski puffer
 - 100 mM Tris, pH 8,0 (Sigma)
 - 100 mM EDTA (Kemika)
 - 250 mM NaCl (Merck)
- o 10-odstotni Na-lauroilsarkozin (Sigma)

- 5 M NaCl
- 10-odstotni heksadecil triamonijev bromid (CTAB; Sigma) v 0,7 M NaCl (Merck)
- Kloroform (Merck) : izoamilalkohol (Kemika) = 24:1
- Izopropanol (Merck)
- Puffer TE
 - 10 mM Tris (Sigma), pH s HCl uravnali na pH 7,6
 - 1 mM EDTA (Kemika)
- M Na-acetat, pH 5; pH smo uravnali z očetno kislino
- Absolutni etanol in 70-odstotni etanol (Merck)
- Proteinaza K (Fermentas)
- Rnaza A (1 mg/ml; Sigma)

Tri grame zamrznjenih celic smo uprašili v terilnici ob hlajenju s tekočim dušikom. Resuspendirali smo jih v 10 ml ekstrakcijskega pufra, ki smo mu dodali proteinazo K v končni koncentraciji 0,5 mg/ml. Suspenziji smo dodali 1/10 volumna 10-odstotnega Na-lauroilsarkozina in inkubirali preko noči na stresalniku s 170 vrtljaji na minuto pri temperaturi 50 °C.

Po inkubaciji smo na 1 ml vzorca dodali po 170 µl 5 M NaCl in 135 µl 10-odstotnega CTAB v 0,7 M NaCl. Inkubirali smo 30 minut pri 65 °C in stresanju 50 vrtlj./min. Sledila je ekstrakcija z enim volumnom mešanice kloroform:izoamilalkohol (24:1, v/v), ki smo jo ponavljali tako dolgo, dokler ni bila interfaza med organskimi topili in vodno raztopino povsem bistra. Pri ločevanju topil smo si pomagali s 5-minutnim centrifugiranjem pri 5000×g in 4 °C. Iz vodne faze smo nato oborili nukleinske kisline z dodatkom 0,6 volumna 2-propanola in dveurno inkubacijo pri -20 °C. Pelet, dobljen po 10-minutnem centrifugiranju pri 5000×g in 4 °C, smo raztapljali v 500 µl pufra TE 10 minut. Raztapljanje smo ponovili še trikrat in frakcije prenesli v štiri ločene sterilne mikrocentrifugirke po Eppendorfu. Iz dobljenih vodnih frakcij smo nukleinske kisline oborili z etanolno precipitacijo s predhodnim nakisanjem (1/10 volumna Na-acetata, pH 5, in 2 volumna absolutnega etanola). Obarjanje je potekalo preko noči pri -20 °C, nakar smo DNA dokončno ločili od raztopine s centrifugiranjem pri 14000×g in 4 °C 15 min. Pelet smo dvakrat sprali z 1 ml 70-odstotnega etanola z vmesnim centrifugiranjem (14000×g, 4 °C, 10 min), ga posušili pri sobni temperaturi in raztopili v 500 µl pufra TE. Raztopino DNA smo nato še enkrat čistili z mešanico kloroform:izoamilalkohol in po ločitvi vodne faze ponovno oborili DNA z etanolno precipitacijo s predhodnim nakisanjem, inkubacijo preko noči pri -20 °C in centrifugiranjem (14000×g, 4 °C, 15 min). Pelet smo zopet dvakrat sprali s 70-odstotnim etanolom in ga tokrat raztopili v 200 µl pufra TE. Raztopini smo dodali 100 µl RNaze A, inkubirali 1 h pri 37 °C in ponovili etanolno precipitacijo s predhodnim nakisanjem in inkubacijo preko noči. Po centrifugiranju smo pelet še zadnjič sprali z etanolom (70-odstotni, 1 ml), ga posušili in raztopili v 150 µl pufra TE.

Integriteto izolirane DNA smo ocenili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze (1-odstoten agarozni gel, m/v), koncentracijo in čistost vzorcev pa smo izmerili s spektrofotometrom

pri 260 nm oz. 280 nm, pri čemer smo upoštevali, da je pri koncentraciji DNA 50 µg/ml optična gostota $OD_{260} = 1$. Za nadaljnje postopke smo uporabljali vzorce nerazgrajene DNA, katerih razmerje $A_{260/280}$ je presegalo vrednost 1,8.

3.3 AGAROZNA ELEKTROFOREZA DNA

Reagenti:

- 10× pufer TBE, pH 8,0
 - Tris (Sigma) 108,99 g
 - borova kislina (Sigma) 55,65 g
 - EDTA (Kemika) 7,44 g
 - destilirana voda do 1000 ml
- 5× nanašalni pufer
 - bromfenol modro (Sigma) 0,25 g
 - ksilen cianol (Sigma) 0,25 g
 - glicerol (Kemika) 30 ml
 - destilirana voda do 100 ml
- agaroz (SeaKem, BMA)
- etidijev bromid (Sigma)

Elektroforeza je potekala v aparaturi HE 33 (Hoefer) pri 100V v 0,5× pufru TBE in 1-odstotnem agaroznem gelu. Gel smo pripravili z 0,5× pufrom TBE in mu dodali 10 µg etidijevega bromida na 100 ml gela. Vzorcem DNA smo pred nanosom na gel dodali 1/5 volumna 5× nanašalnega pufra, kot standard pa smo na gel nanесли mešanico fragmentov DNA znanih velikosti (GeneRuler™, Fermentas). Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV-transluminatorjem in ga fotografirali. Velikost DNA smo določili primerjalno s fragmenti DNA znanih velikosti.

3.4 IZOLACIJA CELOKUPNE RNA

Reagenti:

- TRI REAGENT™ (Sigma)
- dietilpirokarbonat (DEPC; Sigma)
- kloroform (Merck)
- izopropanol (Merck)
- 75-odstotni etanol

Celokupno RNA smo iz celic *A. pullulans* izolirali z reagentom TRI REAGENT™. Vso steklovino smo pred uporabo sterilizirali z 8-urno suho sterilizacijo pri 180 °C in obenem s tem inaktivirali RNaze. RNaze na plastičnih mikrocentrifugirkah smo inaktivirali z

inkubacijo v 0,3-odstotni raztopini dietilpirokarbonata (DEPC) preko noči in jih nato avtoklavirali. Vodo MilliQ, ki smo jo uporabljali pri delu z RNA, smo obdelali z 0,1-odstotnim DEPC tako, da smo litru vode dodali 1 ml DEPC, pretresli in pustili preko noči pri sobni temperaturi v temi, nato pa avtoklavirali. Kemikalije in nastavki za pipete, ki smo jih uporabljali, so bile brez RNaz in DNaz.

Zamrznjene celice, ki so bile izpostavljene hiperosmotskemu stresu, smo uprašili v terilnici ob hlajenju s tekočim dušikom in jih prenesli v mikrocentrifugirke po Eppendorfu. Zamrznjene celice vseh ostalih vzorcev smo razbili z jeklenimi kroglicami v napravi MixerMill (Retsch[®] MM 301) pri frekvenci stresanja 30/min, čas stresanja je bil dve minuti. Mikrocentrifugirke z vzorci, jeklene kroglice in nosilce za mikrocentrifugirke smo pred tem ohladili v tekočem dušiku, tako da je bila temperatura med razbijanjem celic ves čas pod lediščem. Uprašenim celicam (približno 150 mg) smo dodali 1,5 ml TRI REAGENTA[™], temeljito premešali in centrifugirali 10 min pri 12000×g in 4 °C. Supernatant smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko, inkubirali 5 min pri sobni temperaturi, dodali 0,3 ml kloroforma, 15 sekund intenzivno stresali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po centrifugiranju (15 min, 12000×g, 4 °C) smo dobili tri faze: zgornjo-vodno z RNA, vmesno z DNA in spodnjo-organsko s proteini. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 0,75 ml izopropanola, premešali in inkubirali 7 min pri sobni temperaturi. Po 10-minutnem centrifugiranju (12000×g, 4 °C) se je RNA zbrala v peletu na dnu centrifugirke. Pelet smo dvakrat sprali s 75-odstotnim etanolom (vmes smo centrifugirali 5 min pri 12000×g in 4 °C) in nato etanol popolnoma odstranili. Pelet smo nekaj sekund sušili s prepihavanjem z dušikom in ga nato raztopili v 100 µl vode, obdelane z DEPC. RNA smo shranili pri temperaturi -80 °C.

Koncentracijo in čistost vzorcev smo izmerili s spektrofotometrom pri 260 nm in 280 nm in upoštevali, da je $OD_{260} = 1$ pri koncentraciji RNA 4 µg/µl.

3.5 DOLOČANJE DELNEGA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOV

3.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Reagenti:

- 5× reakcijski pufer (Fermentas)
- mešanica deoksinukleotidov (10mM; Fermentas)
- MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
- Taq DNA polimeraza (Fermentas)
- MilliQ voda
- začetni oligonukleotidi (zaporedje baz je navedeno v prilogi A)

Kot matrično DNA smo uporabili genomsko DNA, izolirano iz *A. pullulans*, v končni koncentraciji približno 0,25 µg/µl. Za namnožitev dela genov za encime smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so bili izdelani za namnožitev homolognih genov pri halofilni

črni kvasovki *Hortaea werneckii* (Gostinčar, 2004). Del gena za 28S-rRNA smo namnožili z uporabo začetnikov, kot so jih navedli Rižner in sod., 2001. Končna koncentracija vsakega od začetnih oligonukleotidov je bila 0,75 μ M. V reakcijski mešanici so bile končne koncentracije ostalih reagentov naslednje: 0,5 \times reakcijski pufer, 1 mM dNTP (vsak od deoksinukleotidov v koncentraciji 0,25 mM), 1,5 mM MgCl₂ in 0,0625 enot Taq polimeraze/ μ l reakcijske mešanice. Reakcija je potekala v aparatu UNO II, Biometra, pri naslednjih pogojih namnoževanja:

- 5-minutna denaturacija pri 94 °C
- 30 ciklov:
 - denaturacija pri 94 °C, 30 s
 - prileganje pri 60 °C, 30 s
 - podaljševanje pri 72 °C, 30 s
- 7-minutno podaljševanje pri 72 °C

Velikost in čistost produktov smo preverili z elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu, kot je opisano v poglavju 3.3. Zelene produkte smo izrezali iz gela in jih očistili s kompletom za izolacijo DNA iz agaroznega gela (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) po navodilih proizvajalca. Tako izoliranim produktom namnoževanja delov genov za desaturazi in 28S-rRNA so nukleotidno zaporedje določili v laboratorijih družbe Sequiserve, pomnožek dela gena za elongazo pa smo pred tem dodatno obdelali, kot je opisano v naslednjem poglavju.

3.5.2 Kloniranje dela gena za elongazo

Ker smo del gena za elongazo namnožili z uporabo degeneriranih začetnih oligonukleotidov, ki za sekvenčno reakcijo niso primerni, smo fragment pred določanjem nukleotidnega zaporedja vnesli v ustrezen plazmid. S kompletom reagentov za kloniranje v bakterijske celice *E. coli* (pGEM[®]-T Vector System; Promega) smo namnoženi del gena za elongazo klonirali v plazmid pGEM[®]-T in le-tega vnesli v kompetentne celice *E. coli*, priložene kompletu. Uspešnost kloniranja smo preverili na trdnih gojiščih LB z ampicilinom, IPTG in X-Gal. Dva od izbranih klonov celic smo precepili v 1 ml tekočega gojišča LB z ampicilinom in inkubirali pri 37 °C na stresalniku preko noči. Lizat celic teh dveh klonov smo nato uporabili namesto matrične DNA v verižni reakciji s polimerazo, pri kateri smo preverili, ali imamo v plazmidu želeni fragment. Plazmid pGEM[®]-T smo iz celic enega od klonov izolirali s kompletom FastPlasmid Mini (Eppendorf) in ga poslali v laboratorije družbe Sequiserve, kjer so določili nukleotidno zaporedje fragmenta, kloniranega v plazmid.

3.6 DOLOČANJE ŠTEVILA GENOV ZA DESATURAZI IN ELONGAZO Z ANALIZO ODTISA PO SOUTHERNU

3.6.1 Priprava vzorcev, elektroforeza in prenos na membrano

Reagenti:

Vsi reagenti so bili pripravljene z vodo MilliQ. Vse reagente, razen restrikcijskih endonukleaz, smo po pripravi sterilizirali z avtoklaviranjem.

- restrikcijske endonukleaze
 - *EcoRI* (Fermentas)
 - *HindIII* (Fermentas)
 - *BamHI* (Gibco)
- depurinacijska raztopina
 - 0,25 M HCl
- denaturacijska raztopina
 - 0,5 M NaOH (Zorka Šabac)
 - 1,5 M NaCl (Merck)
- nevtralizacijska raztopina (pH 7,5, uravnali s HCl)
 - 1,5 M NaCl (Merck)
 - 1 M Tris-HCl (Sigma)
 - Tris Base (Tris Base ULTROL®Grade; Calbiochem)
- 20× SSC pufer (pH 7,5)
 - 3 M NaCl (Merck)
 - 3,52 M Na-citrat×2H₂O (Sigma)

Genomsko DNA, izolirano iz *A. pullulans*, smo rezali z restrikcijskimi endonukleazami *EcoRI*, *BamHI* in *HindIII*. Noben od izbranih encimov ni imel restrikcijskih mest v delih genov, ki smo jim določili zaporedje in ki so nam služili kot tarčna zaporedja pri analizi prenosa po Southernu. Restrikcija je potekala šest ur pri temperaturi 37 °C. Dobljene fragmente smo ločili po velikosti z elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu. Pred prenosom na membrano smo gel dvakrat sprali v depurinacijski raztopini (vsakič po deset minut). Sledila je denaturacija dvakrat po dvajset minut v denaturacijski raztopini, zatem pa smo gel dvakrat sprali v nevtralizacijski raztopini (obakrat po trideset minut). Med menjavanjem raztopin smo gel vsakič sprali z vodo MilliQ.

Fragmente DNA smo iz gela prenesli na najlonsko membrano (Sigma) s kapilarnim prenosom z 10×SSC pufrom. Gel smo položili na omočen Whatmanov papir, katerega konca sta segala v 10×SSC, s stranjo, kjer so nanašalni žepki, navzdol. Nanj smo položili najlonsko membrano, ki smo jo pred tem pol ure namakali v 10×SSC pufru, nato Whatmanov papir in suhe papirnate brisače v debelini več kot pet centimetrov. Vse skupaj smo obežili in pustili, da je kapilarni prenos potekal preko noči pri sobni temperaturi. Po prenosu smo membrano posušili na zraku, nato pa DNA fiksirali na membrano z dveurno inkubacijo pri temperaturi 80 °C.

3.6.2 Hibridizacija

Reagenti

- [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (EasytidesTM, NENTM), 3000 Ci/mmol
 - 10×SSC pufer (gl. pogl. 3.6.1)
 - 50× Denhardtov reagent
 - 2-odstotni fikol (Sigma)
 - 2-odstotni polivinilpirolidon (Sigma)
 - 2-odstotni goveji serumski albumin (Sigma)
- Reagent smo hranili pri -20 °C.
- Predhibridizacijska raztopina
 - 6×SSC
 - 0,5-odstotni Na-dodecil sulfat (Sigma)
 - 5× Denhardtov reagent
 - 150 µg/ml DNA iz lososove sperme, denaturirane s segrevanjem pri 100 °C 5 min, dodane tik pred inkubacijo; DNA smo pred tem hranili pri -20 °C.
 - Raztopina za spiranje
 - 2×SSC
 - 0,1-odstoten Na-dodecil sulfat (Sigma)

Za izdelavo hibridizacijske sonde smo uporabili fragmente DNA, namnožene s PCR, kot je opisano v poglavju 3.5.1. Za čiščenje fragmentov smo uporabili postopek z elektroforezo in izolacijo fragmentov iz gela, opisan v istem poglavju. Fragmente smo označili z [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP po navodilih proizvajalca (Prime-It[®] RmT Random Primer Labelling Kit, Stratagene) in označene fragmente očistili s pomočjo kolon (Nuc Trap[®], Stratagene). Uspešnost označevanja smo preverili z merjenjem radioaktivnosti 2 µl sonde v scintilacijskem števcu 1214 RACKBETA (LKB Wallace).

Najlonsko membrano s fiksiranimi produkti restrikcije DNA smo omočili s 5×SSC pufrom (5 min) in jo prenesli v predhibridizacijsko raztopino. Po štirih urah predhibridizacije pri temperaturi 65 °C smo dodali predhodno denaturirano sondo, označeno z ^{32}P , do končne radioaktivnosti 0,8 CPM/ml hibridizacijske raztopine. Inkubacija je potekala ob stresanju preko noči pri temperaturi 65 °C, nakar smo nespecifično vezano sondo spirali z membrane z raztopino za spiranje trikrat po dvajset minut pri enaki temperaturi. Sledila je detekcija specifično vezanih sond. Membrano smo položili na fotografski film (X-OMAT, Kodak), jo eksponirali dva dni pri temperaturi -70 °C in nazadnje film razvili.

3.7 IZDELAVA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA NAMNOŽITEV KRATKIH DELOV GENOV ZA DESATURAZI IN ELONGAZO

Na podlagi nukleotidnih zaporedij delov genov, ki smo jih bili namnožili z uporabo začetnih nukleotidov, izdelanih za odgovarjajoče gene pri *H. werneckii*, smo izdelali nove specifične začetne oligonukleotide, ki smo jih izbrali tako, da smo z njimi pomnožili produkt, dolg med 100 in 350 baznih parov. Po naših navodilih jih je sintetiziral proizvajalec Proligo (Sigma). Te začetne oligonukleotide smo nato uporabili v PCR, kjer je bila matrica komplementarna DNA, izdelana na podlagi mRNA. Njihovo nukleotidno zaporedje je navedeno v prilogi A.

3.8 OBRATNA TRANSKRIPCIJA IN HKRATNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

3.8.1 Priprava komplementarne DNA (cDNA)

Iz celokupne RNA, pripravljene, kot je opisano v poglavju 3.4, smo pripravili komplementarno DNA. RNA smo najprej obdelali z deoksiribonukleazo I (Fermentas) in tako odstranili morebitne nečistoče v obliki DNA. 1 µg celokupne RNA smo skupaj z enoto deoksiribonukleaze I inkubirali v 10 µl 1× reakcijskega pufra z MgCl₂ 30 minut pri temperaturi 37 °C. Nato smo mešanici dodali 1 µl EDTA (25 mM) in encim inaktivirali z desetminutno inkubacijo pri 65 °C. Komplementarno verigo DNA (cDNA) smo sintetizirali s kompletom RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Uporabili smo heksamerne naključne začetne oligonukleotide. V postopku smo sledili navodilom proizvajalca kompleta. Tako smo prepisali celoten transkriptom posameznih vzorcev.

3.8.2 Hkratna verižna reakcija s polimerazo (hkratni PCR)

Za določitev stopnje izražanja izbranih genov pri določenih pogojih rasti smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo, pri kateri v isti reakcijski mešanici uporabimo dva seta začetnih oligonukleotidov (Wong in sod., 1994). En par začetnikov je bil za del gena za encim, ki modificira maščobne kisline, drugi par pa za del gena za 28S-rRNA. Prepisovanje slednjega namreč ni odvisno od slanosti okolja, zato nam je služil kot interni standard, ki naj bi izločil vpliv reakcijskih pogojev in razlike v količini matrične cDNA na končni rezultat.

Pri kvantitativnem PCR je pomembno, da namnoževanje ustavimo, še preden doseže plato, po katerem se količina produkta ne povečuje več eksponentialno. Obenem pa je potrebno pri uporabi različnih začetnih oligonukleotidov znotraj iste reakcijske mešanice zmanjšati možnost kompeticije obeh reakcij za reagente, do katere lahko pride zaradi različne izhodiščne količine matrice za posamezen gen. Zato smo pogoje namnoževanja predhodno določili za vsak gen posebej. Pri tem smo upoštevali tudi, da so razlike med količinami produkta v posameznih reakcijskih mešanicah najbolj izrazite takrat, ko so produkti reakcije po ločitvi v agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom že zaznavni, hkrati pa njihova količina ni bistveno nad mejo zaznavnosti. Za posamezne gene smo v hkratnem

PCR izbrali naslednje število ciklov: Δ^9 -desaturaza – 21 ciklov, Δ^{12} -desaturaza – 24 ciklov, elongaza – 22 ciklov in gen za 28S-rRNA – 16 ciklov. Na začetku reakcije pomnoževanja je bilo v 10 μ l posamezne reakcijske mešanice 1 μ l 10-krat redčene cDNA (pridobljene na način, opisan v prejšnjem poglavju), 0,5 \times reakcijski pufer, 1 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,625 enot Taq polimeraze in 0,375 μ M vsakega od začetnih oligonukleotidov za eno od desaturaz oz. elongazo. Šestnajst ciklov pred koncem reakcije smo le-to prekinili in v vsako reakcijsko mešanico dodali oba začetna oligonukleotida za gen za 28S-rRNA v končni koncentraciji 0,375 μ M. Ostali pogoji namnoževanja so bili enaki, kot je opisano v poglavju 3.5.1.

Produkte hkratnega PCR smo ločili z elektroforezo v 1,5-odstotnem agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom (100 μ g/l). Gele smo osvetlili z UV svetlobo in jih fotografirali pri treh različnih časih ekspozicije. Svetilnost posameznih produktov smo določili z računalniškim programom UN-SCAN-IT (Version 5.1, Silk Scientific Corporation), namenjenim obdelavi digitalnih fotografij gelov. Svetilnost namnoženih produktov je bila sorazmerna njihovi količini, ta pa količini cDNA, ki smo jo sintetizirali na matrici 28S-rRNA in mRNA, ki se je v izbranih dejavnikih okolja prepisala z genov za preučevane encime.

Za vsakega od treh obravnavanih genov smo celoten postopek (hkraten PCR, elektroforetska ločitev v agaroznem gelu, fotografiranje in računalniška obdelava fotografij) trikrat ponovili.

3.8.3 Standardizacija in statistična obdelava podatkov

Podatke o svetilnosti smo najprej standardizirali tako, da smo za vsak vzorec dobljeno svetilnost pomnoženega fragmenta gena za določen encim delili s svetilnostjo pomnoženega fragmenta 28S rRNA. S tem smo se izognili napaki zaradi različne količine matrične cDNA v reakcijskih mešanicah. Da smo zmanjšali vpliv časa osvetlitve na svetilnost, smo kot končne standardizirane svetilnosti za vsak vzorec na posameznem gelu vzeli povprečje, ki smo ga izračunali iz vrednosti, dobljenih pri treh različnih časih ekspozicije. Te standardizirane vrednosti smo nato statistično obdelali po pravilih za poskuse s ponovitvami (Kotar, 2006), s čimer smo odstranili sistematično napako, ki je enaka za vse vzorce v določeni ponovitvi. Iz tako prilagojenih podatkov smo izračunali povprečje in skupno variacijo.

Analizo značilnosti razlik med dobljenimi vrednostmi smo naredili tako, da smo v Excelu izvedli enosmerni ANOVA test in preverili, da je razmerje največje in najmanjše variance manjše od tabelarične kritične meje, t.j. da je varianca dovolj homogena, da dovoljuje ANOVA analizo. Preverili smo, ali v vzorcu obstajajo značilne razlike, in značilnost razlik med posameznimi vrednostmi preverili s Tukey-evim testom s pomočjo XLstat dodatka za Excel.

Za prikaz na grafu smo vse vrednosti določenega poskusa delili s povprečno vrednostjo referenčne gojitve. Ta je bila pri različnih slanostih rast pri 0 % soli (m/v), pri stresu pa rast v času 0. Na grafih smo prikazali odstopanje teh vrednosti od referenčne.

4 REZULTATI

4.1 DELNO NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE GENOV

Z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki so bili izdelani za namnožitev delov genov za desaturazi in elongazo pri glivi *H. werneckii*, smo uspešno pomnožili dele homolognih genov v *A. pullulans*.

4.1.1 Δ^9 -desaturaza

Določili smo zaporedje 306 nukleotidov dolgega dela domnevnega gena za Δ^9 -desaturazo, ki smo ga poimenovali *ApOLE1*. Celoten fragment je v 86 % identičen domnevnemu genu za Δ^9 -desaturazo pri *H. werneckii*, od nukleotida 105 do konca fragmenta pa je v 88 % identičen genu za isti encim pri glivi *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Prevod fragmenta v aminokislinsko zaporedje in primerjava z znanimi peptidi oz. proteini pokaže, da je produkt tega dela gena v 92 % in 88 % identičen zgoraj navedenima desaturazama, z upoštevanjem podobnosti nekaterih aminokislin pa dobimo 95-odstotno in 97-odstotno identičnost.

Nukleotidno zaporedje celotnega gena, ki je bilo določeno naknadno (Gostinčar in sod., 2008), je v javno dostopni bazi podatkov *GenBank* dostopno pod številko DQ901954 (NCBI, 2007a).

4.1.2 Δ^{12} -desaturaza

Dolžina fragmenta, ki smo mu določili zaporedje, je 234 nukleotidov. V delu med nukleotidom 150 in koncem fragmenta je v 84 % identičen genu za Δ^{12} -oleat desaturazo pri *Aspergillus oryzae* (*ode1*), *A. nidulans* (*odeA*) in *A. parasiticus* (*odeA*) in v 83 % identičen domnevnemu genu za Δ^{12} -desaturazo pri *H. werneckii*. V delu med nukleotidoma 95 in 169 je v 87 % identičen genu za enak encim pri glivah *Mortierella isabellina* in *M. alpina*. Prevod fragmenta v aminokislinsko zaporedje pokaže vsaj 80-odstotno identičnost z zaporedji aminokislinskih ostankov v Δ^{12} -oleat desaturazi in podobnih encimih pri glivah *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *Aspergillus (Emericella) nidulans*, *Gibberella fujikuroi* in *H. werneckii*. Ko upoštevamo podobne fizikalno-kemične lastnosti nekaterih aminokislin, pa se podobnost med zaporedji poveča na 85 in več odstotkov.

Gen za Δ^{12} -desaturazo v *A. pullulans* smo poimenovali *ApODE12*. Nukleotidno zaporedje celotnega gena je bilo določeno naknadno (Gostinčar in sod., 2008) in je v javno dostopni bazi podatkov *GenBank* dostopno pod številko DQ901955 (NCBI, 2007b).

4.1.3 Elongaza

Fragment, ki smo mu določili zaporedje, je dolg 548 nukleotidov. Vsebuje dva introna: en je med nukleotidoma 232 in 283, drugi pa med nukleotidoma 354 in 406. Kodirajoče zaporedje na 3' koncu je v 92 % identično domnevnemu genu za elongazo pri *H. wernecki* (*HwELO1*), del v sredini fragmenta (med nukleotidoma 278 in 349) pa je genu *HwELO1* identičen 86-odstotno. Več kot 85 % identičnost kažejo tudi določeni deli fragmenta v poravnavi z genom za elongazo maščobnih kislin pri glivah *Aspergillus clavatus* NRRL1, *Neosartorya fischeri* NRRL181 in *Aspergillus fumigatus* Af293.

Ko kodirajoče zaporedje nukleotidov prevedemo v zaporedje aminokislin, odkrijemo vsaj 90-odstotno identičnost, z upoštevanjem podobnih fizikalno-kemičnih lastnosti določenih aminokislin pa se pokaže 95-odstotna identičnost z (domnevnimi) elongazami zgoraj naštetih organizmov.

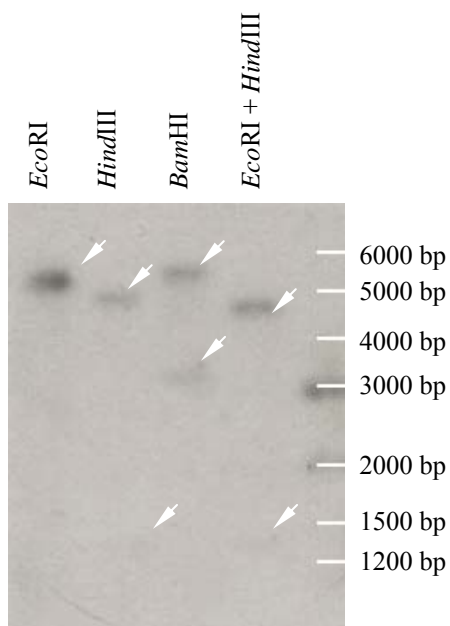
Gen za elongazo pri *A. pullulans* smo poimenovali *ApELO1*. Nukleotidno zaporedje celega gena je bilo določeno naknadno (Gostinčar in sod., 2008) in je v javno dostopni bazi podatkov *GenBank* dostopno pod številko EF123104 (NCBI, 2007c).

4.2 ANALIZA PRENOSA PO SOUTHERNU

4.2.1 Gen za Δ^9 -desaturazo

S hibridizacijo po Southernu, kjer smo kot sondo uporabili radioaktivno označen del gena *ApOLE1*, smo identificirali fragmente genomske DNA, dobljene po restrikciji z izbranimi endonukleazami. Rezultate prikazuje slika 2. DNA, rezana z *EcoRI*, da en signal, ki ustreza fragmentu velikosti okrog 5200 baznih parov. Po rezanju DNA s *HindIII* je sonda hibridizirala z dvema fragmentoma velikosti okrog 4800 in 1300 baznih parov. Tudi po rezanju s kombinacijo obeh encimov (*EcoRI* in *HindIII*) smo dobili signal na dveh fragmentih, tokrat velikosti okrog 4500 in 1300 baznih parov. Hibridizacija sonde z DNA po rezanju z endonukleazo *BamHI* je dala dva signala pri fragmentih velikosti okrog 5500 in 3300 baznih parov.

Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da sta v genomu *A. pullulans* vsaj dve kopiji gena *ApOLE1*.

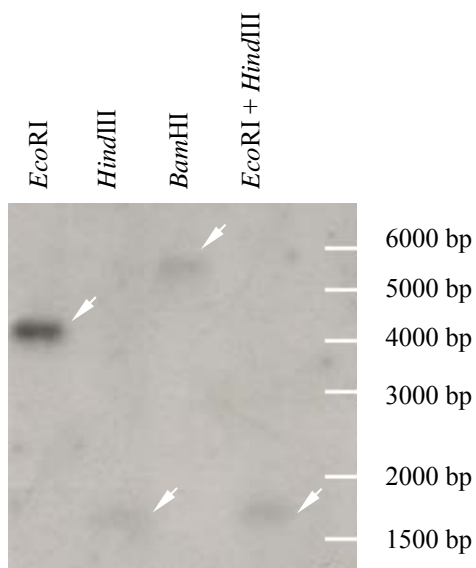


Slika 2: Avtoradiogram genomske DNA za gen *ApOLE1*, rezane z restrikcijskimi endonukleazami *EcoRI*, *HindIII* in *BamHI*.

4.2.2 Gen za Δ^{12} -desaturazo

S hibridizacijo po Southernu, kjer smo kot sondo uporabili radioaktivno označen fragment gena *ApODE12*, smo po hibridizaciji sonde z DNA, razgrajene z *EcoRI*, zaznali signal, ki je ustrezal fragmentu velikosti okrog 4 kb. Po rezanju DNA s *HindIII* in *EcoRI + HindIII* je sonda hibridizirala s fragmentom, velikim okrog 1700 baznih parov. Po hibridizaciji z DNA, razgrajeno z *BamHI*, smo zaznali signal, ki odgovarja fragmentu velikosti okrog 5500 baznih parov.

Iz rezultatov sklepamo, da je gen *ApODE12* v genomu *A. pullulans* prisoten v eni kopiji.

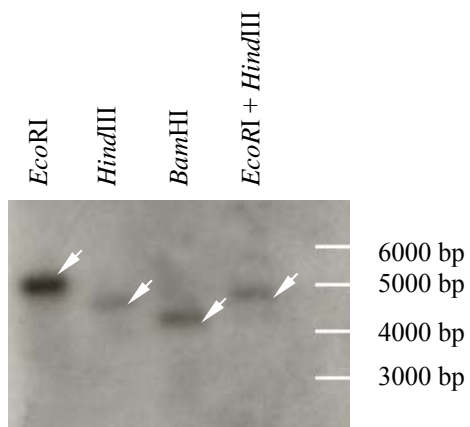


Slika 3: Avtoradiogram genomske DNA za gen *ApODE12*, rezane z restrikcijskimi endonukleazami *EcoRI*, *HindIII* in *BamHI*.

4.2.3 Gen za elongazo

S hibridizacijo po Southernu, kjer smo kot sondo uporabili radioaktivno označen fragment gena *ApELO1*, smo po hibridizaciji sonde z DNA, razgrajene z *EcoRI*, zaznali signal, ki je ustrezal fragmentu velikosti okrog 5 kb. Tudi po hibridizaciji sonde z DNA, razgrajene s *HindIII*, *BamHI* in *EcoRI + HindIII*, smo opazili vsakič le en signal, ti signali pa so odgovarjali fragmentom velikosti okrog 4500, 4300 in 4700 baznih parov.

Sklepamo, da se gen *ApELO1* v genomu *A. pullulans* nahaja v eni kopiji.



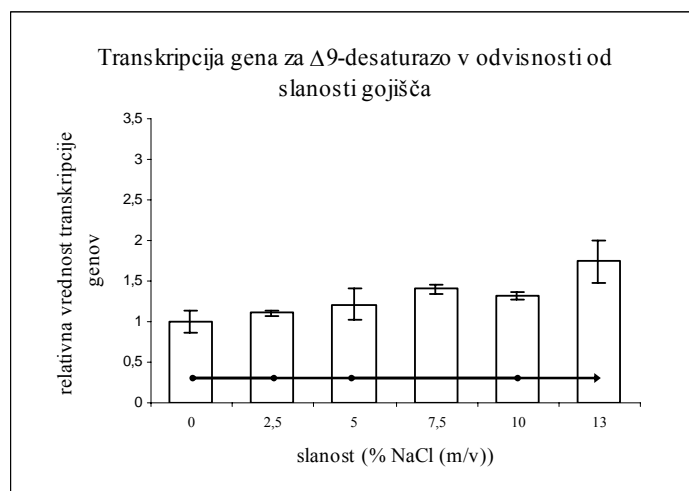
Slika 4: Avtoradiogram genomske DNA za gen *ApELO1*, rezane z restrikcijskimi endonukleazami *EcoRI*, *HindIII* in *BamHI*.

4.3 PREPISOVANJE GENOV ZA DESATURAZI IN ELONGAZO MAŠČOBNIH KISLIN V *A. pullulans*

Na grafih smo prikazali povprečno relativno vrednost transkripcije genov in standardni odklon.

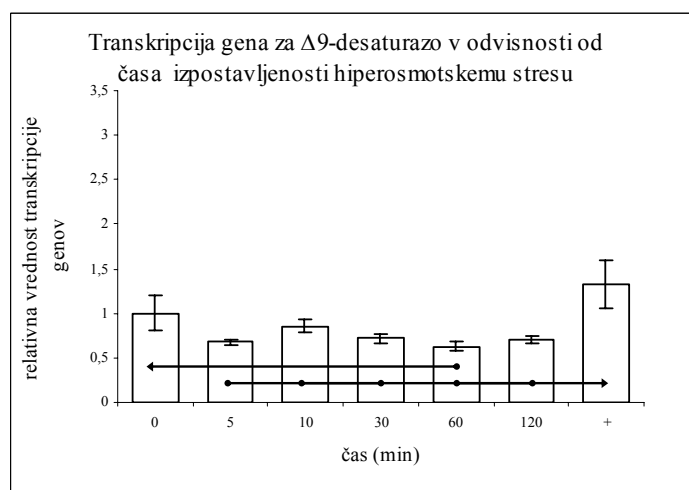
4.3.1 Δ^9 -desaturaza

Ko smo glivo *A. pullulans* gojili pri stalni koncentraciji NaCl v gojišču, delež soli ni značilno vplival na prepisovanje gena *ApOLE1*. Le pri visoki koncentraciji soli (13 % (m/v)) je bila transkripcija tega gena značilno povečana (sl. 5).



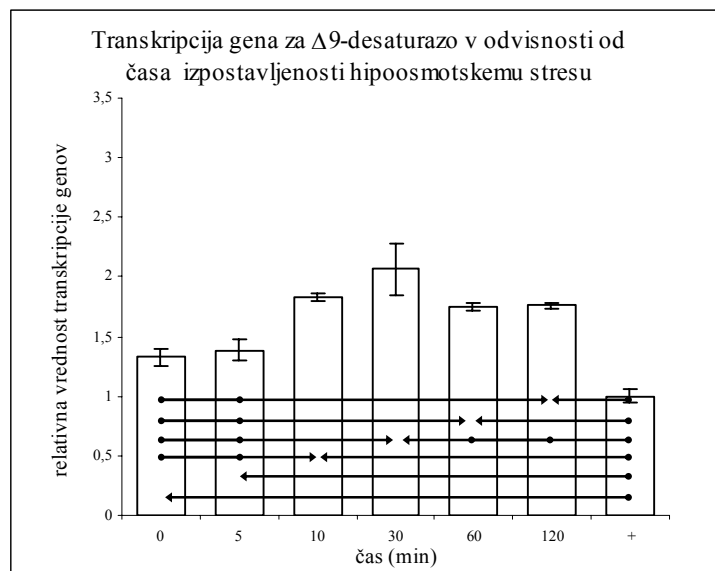
Slika 5: Transkripcija gena *ApOLE1* v celicah, vzgojenih v gojiščih z različnimi deleži dodane soli. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

V celicah, izpostavljenih hiperosmotskemu šoku, smo zaznali statistično značilno zmanjšanje transkripcije gena *ApOLE1* eno uro po spremembi slanosti gojišča. Ves čas, ko so celice rastle v gojišču s povišano slanostjo, pa je bila transkripcija tega gena manjša kot pri celicah, ki so stalno rastle v gojišču z 10 % NaCl (m/v) (sl. 6).



Slika 6: Transkripcija gena *ApOLE1* v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega povečanja deleža soli v gojišču. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Znak + označuje celice, ki so stalno rastle v gojišču z 10 % NaCl (m/v). Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

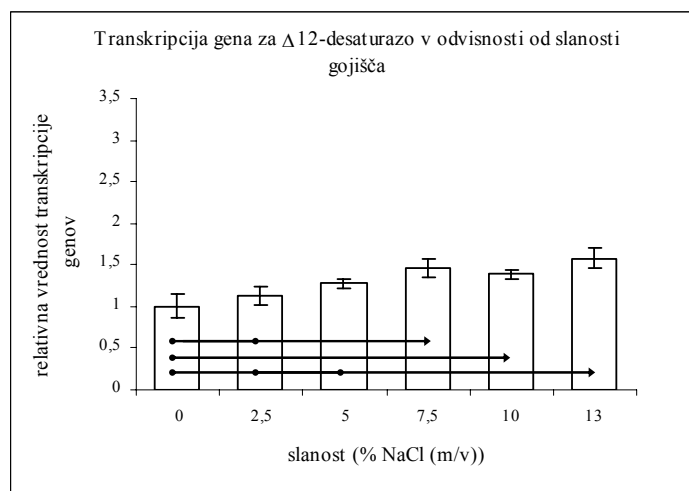
Prvih pet minut po osmotskem šoku zaradi nenadnega zmanjšanja slanosti gojišča se transkripcija gena *ApOLE1* ni opazno spremenila, nato pa se je povečala in ostala značilno višja od začetne vse do konca trajanja poskusa. Največjo vrednost je dosegla 30 minut po izpostavitvi šoku (sl. 7).



Slika 7: Transkripcija gena *ApOLE1* v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega zmanjšanja deleža soli v gojišču. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Znak + označuje celice, ki so stalno rasle v gojišču brez dodane soli. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

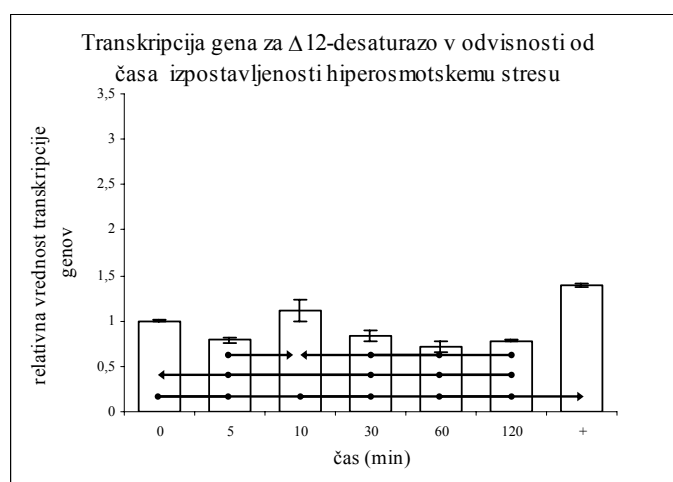
4.3.2 Δ^{12} -desaturaza

Transkripcija gena *ApODE12* se je z naraščanjem slanosti gojišča le počasi povečevala. V gojišču brez dodane soli se je gen prepisoval manj kot v gojišču s 7,5 in več odstotki soli, v gojišču s 13 % NaCl (m/v) pa je bilo izražanje gena večje kot v gojiščih s 5 ali manj odstotki NaCl. Dodatno statistično značilno razliko smo zaznali še med vzorcema z 2,5 in 7,5 % NaCl (m/v) v gojišču (sl. 8).



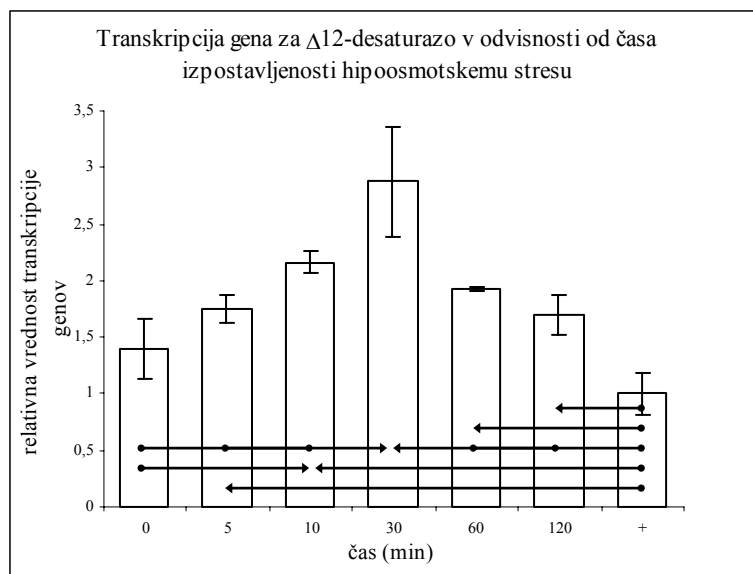
Slika 8: Transkripcija gena *ApODE12* v celicah, vzgojenih v gojiščih z različnimi deleži dodane soli. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

Ob nenadnem povečanju deleža soli v gojišču se je transkripcija gena *ApODE12* zmanjšala, po 10 minutah prehodno narasla in nato zopet padla ter do konca poskusa ostala približno enaka. Ves čas poskusa je bila transkripcija nižja kot v celicah, ki so stalno rasle v gojišču z 10 % NaCl (m/v) (sl. 9).



Slika 9: Transkripcija gena *ApODE12* v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega povečanja deleža soli v gojišču. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Znak + označuje celice, ki so stalno rasle v gojišču z 10 % NaCl (m/v). Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

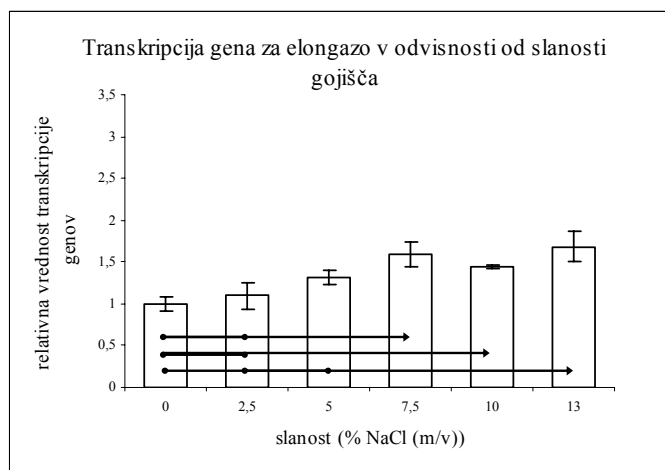
Po nenadnem zmanjšanju slanosti gojišča se je prepisovanje gena *ApODE12* povečalo in doseglo vrh po 30 minutah, nato pa upadlo. Ves čas po vzpostavitvi stresa pa je bila transkripcija tega gena značilno večja kot pri celicah, ki so stalno rasle v gojišču brez soli (sl. 10).



Slika 10: Transkripcija gena *ApODE12* v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega zmanjšanja deleža soli v gojišču. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Znak + označuje celice, ki so stalno rasle v gojišču brez dodane soli. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

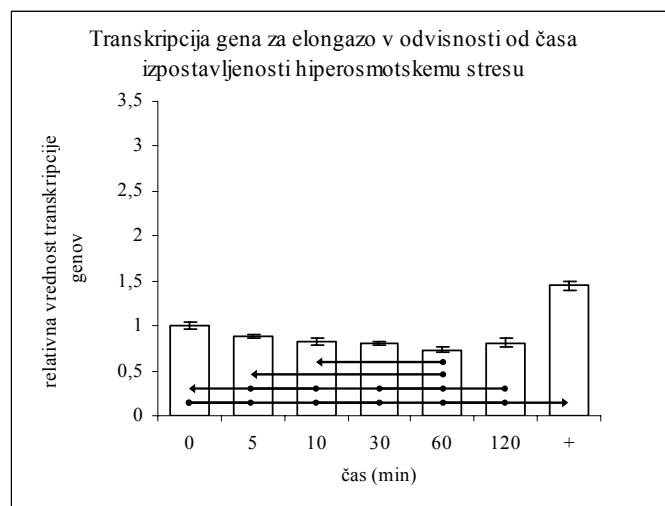
4.3.3 Elongaza

Pri višjih koncentracijah soli v gojišču (7,5 in več % NaCl (m/v)) je bilo prepisovanje gena *ApELO1* statistično značilno večje kot v gojišču brez in z 2,5 % NaCl (m/v). V gojišču s 13 % soli (m/v) je bila transkripcija tega gena tudi večja kot v gojišču s 5 % NaCl (m/v) (sl. 11).



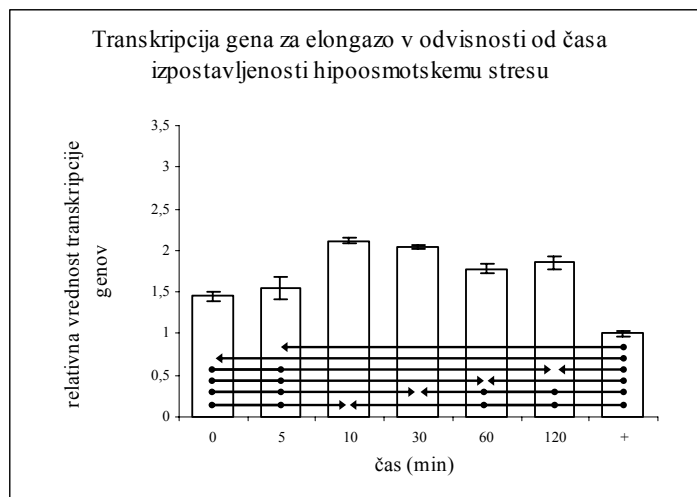
Slika 11: Transkripcija gena *ApELO1* v celicah, vzgojenih v gojiščih z različnimi deleži dodane soli. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

Ob povečanju slanosti gojišča se je transkripcija gena za elongazo že v prvih petih minutah zmanjšala in nato ostala približno enaka do konca trajanja poskusa. Dodatno zmanjšanje transkripcije smo zaznali še 60 minut po začetku stresa. Ves čas trajanja poskusa pa se transkripcija ni dvignila do nivoja, kot smo ga zaznali pri stalnem gojenju celic pri 10 odstotkih soli v gojišču (sl. 12).



Slika 12: Transkripcija gena *ApELO1* v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega povečanja deleža soli v gojišču. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Znak + označuje celice, ki so stalno rasle v gojišču z 10 % NaCl (m/v). Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

Deset minut po nenadnem zmanjšanju slanosti gojišča je transkripcija gena *ApELO1* narasla in po 60 minutah nekoliko padla, vendar je ostala višja kot na začetku poskusa (ob času 0 in 5 minut). V celicah, podvrženih hipoosmotskemu stresu, je bilo prepisovanje tega gena ves čas večje kot v celicah, ki so stalno rasle v gojišču brez soli (sl.13).



Slika 13: Transkripcija gena *ApELO1* v celicah, izpostavljenih stresu zaradi nenadnega zmanjšanja deleža soli v gojišču. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi podatkov o količini mRNA, ki smo jo določili z analizo produktov verižne polimerizacije po obratni transkripciji. Znak + označuje celice, ki so stalno rasle v gojišču brez dodane soli. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili s puščicami. Pike na puščici označujejo vzorce, pri katerih je transkripcija genov statistično značilno manjša kot v vzorcu, na katerega kaže konica puščice.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.2 RAZPRAVA

V raziskavi smo poiskali in določili delna nukleotidna zaporedja treh genov, vpletenih v modifikacije maščobnih kislin pri halotolerantni črni kvasovki *A. pullulans*. S primerjavo z znanimi nukleotidnimi in aminokislinskimi zaporedji pri drugih organizmih smo potrdili njihovo identifikacijo. Nato smo preverili število kopij teh genov v genomu *A. pullulans* in preučili njihovo transkripcijo v povezavi s koncentracijo soli v okolju. Pri tem smo se opirali na podatke o vplivih slanosti na lipidno sestavo tega organizma, kot so jih preučili Turk in sod. (2004).

5.1.1 Izražanje genov pri stalni koncentraciji soli v gojišču

Povečanje nenasičenosti maščobnih kislin lahko pomaga ohranjati ustrezno fluidnost membran pri visokih slanostih (Russel, 1989; Hazel in Williams, 1990). Turk in sod. (2004) so ugotovili, da pri *A. pullulans* z naraščanjem koncentracije soli v gojišču pada delež stearinske (C18:0) in oleinske (*cis*-C18:1^{Δ9}) maščobne kisline, narašča pa delež linolne (*cis*-C18:2^{Δ9,12}) maščobne kisline. Da se to lahko zgodi, je potrebno delovanje dveh encimov, Δ⁹- in Δ¹²-desaturaze. Pri stalnem gojenju celic *A. pullulans* pri določeni slanosti se pokaže, da se pri večjih slanostih domnevna gena za Δ⁹- in Δ¹²-desaturazo zares bolj izražata.

Delež palmitinske (C16:0) maščobne kisline v celicah *A. pullulans* se s slanostjo bistveno ne spreminja (Turk in sod., 2004). Porast linolne maščobne kisline lahko zato bolj kot elongaciji že prisotnih C16:0 maščobnih kislin pripišemo desaturaciji verig z 18 C atomi ali pa njihovi *de novo* sintezi. Za slednjo pa je potrebno sodelovanje elongaz, saj sintaza maščobnih kislin ne sintetizira verig z več kot 16 C atomi (Trotter, 2001).

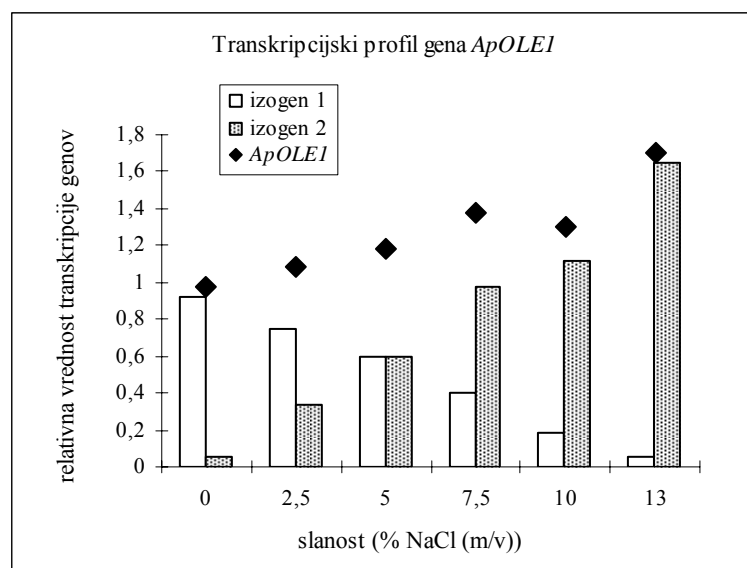
5.1.1.1 *ApOLE1*, domnevni gen za Δ⁹-desaturazo

Izražanje gena *ApOLE1* je statistično značilno največje pri najvišji slanosti (sl. 5). Če primerjamo le povprečne vrednosti izražanja genov, pa je trend naraščanja zaznaven ves čas povečevanja koncentracije soli v gojišču.

Rezultati hibridizacije po Southernu nakazujejo, da bi lahko bila v genomu *A. pullulans* dva domnevna gena za Δ⁹-desaturazo. Takšna izogena sta morda različno regulirana. *S. cerevisiae* ima npr. izogene za mnogo encimov, ki sodelujejo v metabolizmu sladkorjev, transkripcija enega od njih/njiju pa po svoji intenzivnosti izstopa. Prepisovanje mnogih izogenov s slabšim izražanjem inducira prav osmotski šok, ki lahko ob tem tudi inhibira izražanje tiste kopije gena, ki je v običajnih razmerah bolj aktivna. Produkt gena, ki se izraža ob osmotskem šoku, je morda v spremenjenih pogojih bolj stabilen kot tisti, ki se izraža v normalnih pogojih (Rep in sod., 2000). Poleg tega bi moral v primeru gena

ApOLE1 encim, ki se sintetizira pri višjih slanostih, imeti večjo aktivnost oz. afiniteto do substrata. Takšna razlaga bi pojasnila, zakaj je pri visokih slanostih v celicah *A. pullulans* več Δ^9 -nenasičenih maščobnih kislin, kljub temu, da se skupno izražanje izogenov *ApOLE1* pri različnih slanostih skoraj ne spreminja. Možno razlago transkripcijskega profila *ApOLE1* kot vsote transkripcijskih profilov dveh izogenov prikazuje slika 14.

Morda obstajajo tudi posttranskripcijski mehanizmi regulacije aktivnosti Δ^9 -desaturaze. V tem primeru se pri višjih slanostih aktivnost encima poveča, kar odstrani potrebo po povečanju njegove koncentracije.



Slika 14: Transkripcijski profil gena *ApOLE1* kot vsota transkripcijskih profilov dveh izogenov. S točkami so označene povprečne relativne vrednosti transkripcije gena *ApOLE1*, kot smo jih izmerili v raziskavi, stolpci pa označujejo hipotetično transkripcijo dveh različnih izogenov.

5.1.1.2 *ApODE12*, domnevni gen za Δ^{12} -desaturazo

Največji vpliv na zmanjšanje temperature prehoda maščobnih kislin iz gelskega v tekoče stanje ima nastanek prve dvojne vezi v molekuli (Los in Murata, 1998). To reakcijo katalizirajo Δ^9 -desaturaze. Δ^{12} -desaturaze v molekulo, ki že ima dvojno vez na mestu Δ^9 , uvedejo dodatno dvojno vez. Čeprav njen vpliv na fluidnost membrane ni tako izrazit, pa s tem Δ^{12} -desaturaza pri *A. pullulans* morda celicam omogoča bolj rafinirano uravnavanje fluidnosti in je lahko eden od dejavnikov, zaradi katerih je *A. pullulans* halotolerantna - v nasprotju z na sol občutljivo *S. cerevisiae*, ki Δ^{12} -desaturaz nima.

Izražanje gena *ApODE12* narašča z naraščajočo koncentracijo soli v gojišču (sl. 8), kar je v skladu z naraščanjem deleža linolne kisline (*cis*-C18:2 $^{\Delta 9,12}$), kot so ga izmerili Turk in sod. (2004).

5.1.1.3 *ApELO1*, domnevni gen za elongazo

S. cerevisiae ima tri različne elongaze z afinitetami za različno dolge substrate (Trotter, 2001; Prasitchoke in sod., 2007). V genomu *A. pullulans* smo identificirali le en domneven gen za elongazo. S povečevanjem slanosti se povečuje tudi njegovo izražanje (sl. 11), vendar pa Turk in sod. (2004) pri višjih slanostih niso zaznali porasta dolgih maščobnih kislin na račun C16 maščobnih kislin. Morda je razpolovna doba mRNA gena *ApELO1* v slanem okolju krajša in samo prepisovanje gena še ne privede do povečane sinteze encima, ali pa je le-ta zaradi prisotnosti kompatibilnih topljencev manj aktiven, kljub temu, da naj slednji ne bi vplivali na funkcionalnost encimov.

Druga možnost je, da porast deleža linolne kisline ne izvira samo iz vnašanja dodatnih dvojnih vezi v nasičene in nenasičene C18 maščobne kisline, temveč tudi iz *de novo* sinteze. Ker sintaza maščobnih kislin ne sintetizira verig z več kot 16 C atomi (Trotter, 2001), je za nastanek C18 maščobnih kislin potrebno delovanje elongaze, kar pojasni povečano prepisovanje njenega gena pri višjih slanostih. Tudi nekoliko povečan delež palmitinske kisline pri najvišji slanosti (v primerjavi s srednje visoko slanostjo; Turk in sod., 2004) morda izvira iz *de novo* sinteze, dejstvo, da še ni podaljšan v C:18 maščobne kisline, pa lahko nakazuje, da je pri visokih slanostih okolja aktivnost elongaze manjša.

5.1.2 Izražanje genov pri stresu zaradi povečanja slanosti gojišča

Izražanje vseh treh genov se je že v petih minutah po povečanju koncentracije NaCl v gojišču zmanjšalo (sl. 6, 9 in 12). Ta razlika je bolj izrazita pri genih *ApODE12* in *ApELO1*. Te spremembe so sicer v nasprotju s pričakovanji glede na meritve mRNA v celicah, ki so konstantno rasle pri različnih slanostih, je pa podobno prehodno zmanjšanje izražanja gena za desaturaze znano tudi za gen *OLE1* pri *S. cerevisiae*. Izražanje tega gena se je zmanjšalo 45 minut po povečanju osmolarnosti gojišča (Rep in sod., 2000), 90 minut po začetku stresa pa je bilo že več kot dvakrat večje kot na začetku (Yale in Bohnert, 2001). Začetno zmanjšanje izražanja genov lahko povežemo z zastojem rasti, do katerega pride ob slanostnem šoku (Rep in sod., 2000).

Lahko pa, da je zmanjšano izražanje genov za desaturaze pri *A. pullulans* del njihovega odziva na slanostni stres. Uvajanje dvojnih vezi v acilne verige fosfolipidov in krajšanje njihovih verig v umetnih membranah povečata prepustnost za glicerol (Blomberg in Adler, 1992). Znana sta vsaj dva halotolerantna organizma (*Z. rouxii* in *Dunaliella* sp.), ki s povečano nasičenostjo acilnih verig v membranah preprečita iztekanje glicerola in vstopanje Na⁺ ionov v celice (Yoshikawa in sod., 1995; Xu in Beardall, 1997). Če se izražanje genov za desaturaze pri *A. pullulans* na začetku stresa zmanjša, morda s tem celica pridobi čas, da vzpostavi druge mehanizme, ki ohranjajo primerno sestavo citoplazme. Tudi pri *S. cerevisiae* se nekateri znani elementi stresnega odziva na začetku stresa ne odzovejo ali so celo reprimirani, izražati pa se začnejo kasneje (Yale in Bohnert, 2001).

Možno je tudi, da se celice spopadajo z nenadnimi spremembami vodne aktivnosti drugače kot z vplivi stalno nizke vodne aktivnosti. Odziv na spremembo turgorja ima v tem primeru prednost pred odzivom na zmanjšanje vodne aktivnosti kot take.

Povečanje koncentracije soli v okolju ni le osmotski, temveč tudi ionski stres (Allakhverdiev in sod., 2000; Umezawa in sod., 2002). Zmanjšanje transkripcije domnevnih genov za encime, ki modificirajo maščobne kisline, morda razbremeni biosintetski aparat v korist sinteze tistih elementov, ki celico rešujejo pred vplivom Cl^- in citotoksičnih Na^+ ionov, ki ob stresu vdrejo v celico, prilagoditev na osmotske vplive pa se vzpostavi šele pozneje.

Za vzorec izražanja gena *ApOLE1* obstaja še ena možna razlaga. Če sta produkta obeh kopij gena res različno aktivna pri različnih slanostih, se lahko njuno izražanje ob hiperosmotskem stresu različno in morda celo izrazito spremeni, na sliki skupnega izražanja pa se to ne pokaže. Skupno izražanje genov tako lahko ostaja enako ali pa se celo zmanjša, aktivnost nastalega encima pa je kljub temu višja kot prej.

V nobenem primeru ni izražanje genov v času trajanja stresa (120 minut) doseglo ravni, kakršno so imele celice, ki so stalno rasle pri takšni slanosti, kot smo jo vzpostavili s stresom. Izgleda, da je za dokončno prilagoditev potrebno precej več časa. V tem *A. pullulans* ni nikakršna izjema med organizmi. Halotolerantna alga *D. salina* npr. potrebuje deset ur, da se celice po slanostnem šoku toliko prilagodijo na nove razmere, da se začnejo deliti (Azachi in sod., 2002).

5.1.3 Izražanje genov pri stresu zaradi zmanjšanja slanosti gojišča

Deset minut po prenosu celic *A. pullulans* iz slanega gojišča v gojišče brez soli se je izražanje vseh treh genov prehodno povečalo, kasneje pa upadlo, vendar ne do ravni, kakršno so imeli pri stalni rasti v odsotnosti soli (sl. 7, 10 in 13). Vzrok za zadnje opažanje je verjetno enak kot pri hiperosmotskem stresu - prekratek čas trajanja izpostavljenosti spremenjeni slanosti. Začasen porast izražanja genov za desaturazi lahko služi povečanju prepustnosti membrane, kar celici omogoči, da se ob prehodu v hipoosmotsko okolje hitro znebi odvečnega glicerola. Elongacija maščobnih kislin ima sicer na prepustnost membran ravno nasproten učinek (Blomberg in Adler, 1992), morda pa v tem primeru poskrbi, da se fluidnost membrane zaradi delovanja desaturaz preveč ne poveča.

5.2 SKLEPI

- 1) V genomu halofilne črne kvasovke *A. pullulans* smo identificirali dva gena z zapisom za desaturazi (*ApOLE1* in *ApODE12*) in gen za elongazo (*ApELO1*). Gen za Δ^9 -desaturazo (*ApOLE1*) bi bil lahko v genomu *A. pullulans* prisoten v dveh kopijah, ostala dva gena pa v eni.
- 2) Na izražanje teh genov vpliva slanost okolja. Transkripcija genov za Δ^{12} -desaturazo in elongazo je večja pri večjih koncentracijah soli v okolju, transkripcija gena za Δ^9 -desaturazo pa je statistično značilno povečana samo pri najvišji koncentraciji soli v gojišču, pri kateri *A. pullulans* še lahko raste.
- 3) Hiperosmotski šok zmanjša transkripcijo genov za Δ^{12} -desaturazo in elongazo, na transkripcijo gena za Δ^9 -desaturazo pa ne vpliva.
- 4) Hipoosmotski stres izzove prehodno povišanje izražanja pri vseh treh preučenihih genih.

6 POVZETEK

Ekstremofilni organizmi imajo velik potencial pri iskanju rešitev za številne probleme današnjega časa. Med temi je gotovo najbolj pereče obremenjevanje okolja, ki zadeva celotno človeštvo. Pomembno mesto med ekstremofili zavzemajo halofilni in halotolerantni organizmi. Zasoljevanje kmetijskih površin ogroža poljedelstvo na vse večjih površinah in poznavanje prilagoditev, ki so jih v evoluciji razvili halofilni in halotolerantni organizmi, nam lahko pomaga pri razvoju proti soli odpornih poljščin. Zaradi večje evolucijske in funkcionalne bližine z rastlinami so za ta namen evkariontski organizmi, kot je črna kvasovka *Aureobasidium pullulans*, primernejši od prokariotskih.

A. pullulans je ubikvitaren mikroorganizem, ki ga pogosto najdemo v okoljih z nizko vodno aktivnostjo. Razmeroma malo je znanega o prilagoditvah, ki mu to omogočajo. Vemo, da v slanem okolju v celicah kot glavni kompatibilni topljenec kopiči glicerol, pa tudi to, da se na povečano slanost odzove s spremenjeno sestavo celičnih membran. To ni presenetljivo, saj je pri enoceličarjih celična membrana v neposrednem stiku z okoljem in je tako najbolj dovzetna za zunanje vplive. Ker so številne vitalne funkcije membrane odvisne od njene fluidnosti, le-ta pa je odvisna od obdajajočega medija in lipidne sestave membrane, celica z uravnavanjem sestave svojih membran nadzoruje njihovo funkcionalnost in integriteto, ki je nujna za preživetje organizma. Vsebnost sterolov ter dolžina in stopnja nenasičenosti maščobnih kislin, ki so sestavni del membranskih lipidov, sta bistvena elementa, ki ju celica spreminja glede na razmere v okolju. Lipidna sestava membran je odvisna od intenzivnosti sinteze, modifikacij in selektivne razgradnje maščobnih kislin ter od njihove vgradnje v membranske lipide.

Predhodne raziskave so pokazale, da so maščobne kisline v celičnih membranah *A. pullulans* pri višjih slanostih bolj nenasičene, predvsem na mestih Δ^9 in Δ^{12} . Te spremembe smo skušali pojasniti s spremembami v izražanju encimov, ki sodelujejo pri njihovi modifikaciji. Z uporabo začetnih oligonukleotidov, izdelanih na podlagi zaporedja homolognih genov pri črni kvasovki *Hortaea werneckii*, smo z verižno reakcijo s polimerazo v genomu *A. pullulans* identificirali dele genov za elongazo (*ApELO1*) ter Δ^9 - in Δ^{12} -desaturazo (*ApOLE1* in *ApODE12*) in določili njihovo zaporedje. Z analizo odtisov po Southernu smo ugotovili, da se gen za Δ^9 -desaturazo v genomu nahaja v vsaj dveh kopijah, ostala dva gena pa v eni. Iz celic, namnoženih v gojiščih z različnimi koncentracijami NaCl, ter iz tistih, ki smo jih za določen čas izpostavili osmotskemu šoku, smo izolirali celokupno RNA in s pomočjo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo ocenili relativno količino mRNA posameznega gena glede na 28S rRNA, katere izražanje ni odvisno od slanosti.

Ugotovili smo, da transkripcija genov *ApELO1* in *ApODE12* s povečevanjem slanosti gojišča narašča, transkripcija gena *ApOLE1* pa je značilno povečana le pri najvišji testirani slanosti (13 % NaCl (m/v)). Ker slednje ni bilo v skladu z našo hipotezo, smo kot možno

razlago predlagali različno transkripcijo vsakega od izogenov *ApOLE1*, pri čemer bi lahko imel encim, ki se bolj intenzivo sintetizira pri višjih slanostih, v teh razmerah tudi večjo aktivnost. Na enak način bi razložili tudi opažanje, da se transkripcija istega gena pri nenadnem povišanju slanosti gojišča skoraj ne spremeni. Nasprotno se transkripcija genov *ApELO1* in *ApODE12* ob hiperosmotskem stresu hitro zmanjša, kar razlagamo s trenutnim zastojem rasti in/ali aktiviranjem drugih dejavnikov obrambe pred vplivom soli. Ob hipoosmotskem stresu (prenosu celic iz gojišča z 10 % NaCl (m/v) v gojišče brez soli) se je transkripcija vseh treh genov najprej povečala in nato zopet zmanjšala. S povečano transkripcijo genov za desaturazi lahko celica poveča prepustnost membrane in se tako morda hitreje znebi odvečnih kompatibilnih topljencev, ki v hipoosmotskem okolju niso potrebni. Elongacija maščobnih kislin ima sicer na prepustnost membran ravno nasproten učinek, morda pa v tem primeru poskrbi, da se fluidnost membrane zaradi delovanja desaturaz vendarle ne poveča preveč. Ugotovitev, da ni transkripcija nobenega od encimov v času trajanja hiper- in hipoosmotskega stresa dosegla ravni, kakršno je imela ob stalni rasti pri določeni slanosti, kaže, da celice za popolno prilagoditev na nove razmere potrebujejo več kot dve uri.

7 VIRI

Adams M.R., Moss M.O. 2000. Food microbiology. 2nd ed. Cambridge, Royal Society of Chemistry: 479 str.

Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nishiyama Y., Inaba M., Murata N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. Plant Physiology, 123: 1047–1056

Atlas R.M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th ed. California (USA), Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: 694 str.

Azachi M., Sadka A., Fisher M., Goldshlag P., Gokhman I., Zamir A. 2002. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiology, 129: 1320-3402

Bencheqroun S.K., Bajji M., Massart S., Labhilili M., Jaafari S. el, Jijakli M.H. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: evidence for the involvement of competition for nutrients. Postharvest Biology and Technology, 46: 128–135

Blomberg A., Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. Advances in Microbial Physiology, 33: 145-212

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Bioresource Technology, 98: 534–538

Christov L.P., Myburgh J., O'Neill F.H., Van Tonder A., Prior B.A. 1999. Modification of the carbohydrate composition of sulfite pulp by purified and characterized β -xylanase and β -xylosidase of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnology Progress, 15: 196-200

Christov L.P., Prior B.A. 1997. Bleaching response of sulfite pulps to pretreatment with xylanases. Biotechnology Progress, 13: 695-698

Duraković S., Duraković L. 2003. Mikologija u biotehnologiji. Zagreb, Kugler: 447 str.

Elcock A. H., McCammon J. A. 1998. Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. Journal of Molecular Biology, 280, 4: 731-748

Gams W., Seifert K. A. 2001. Deuteromycetes (Fungi Imperfecti). V: Encyclopedia of life sciences. Chichester (UK), John Wiley & Sons, Ltd.
<http://www.els.net/> (doi: 10.1038/npg.els.0000351) (feb. 2008): 8 str.

Gostinčar C. 2004. Vpliv slanosti na transkripcijo genov za encime, ki sodelujejo pri modifikaciji maščobnih kislin pri halofilni črni kvasovki *Hortaea werneckii*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 56 str.

Gostinčar C., Trbuha T., Turk M., Vaupotič T., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2007a. *Aureobasidium pullulans* putative delta-9 desaturase (*Ole1*) gene, complete cds. V: Bethesda, National Center for Biotechnology - NCBI GenBank (maj 2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=159906223> (maj 2008)

Gostinčar C., Trbuha T., Turk M., Vaupotič T., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2007b. *Aureobasidium pullulans* putative delta-12 desaturase (*Ode12*) gene, complete cds. V: Bethesda, National Center for Biotechnology - NCBI GenBank (maj 2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=159906225> (maj 2008)

Gostinčar C., Trbuha T., Turk M., Vaupotič T., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2007c. *Aureobasidium pullulans* putative fatty acid elongase protein (*Elo1*) gene, complete cds. V: Bethesda, National Center for Biotechnology - NCBI GenBank (maj 2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=159906227> (maj 2008)

Gostinčar C., Turk M., Trbuha T., Vaupotič T., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2008. Expression of fatty-acid-modifying enzymes in the halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress. *Studies in Mycology*: sprejeto v tisk

Gunde-Cimerman N., Zalar P., Hoog S. de, Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240

Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitaš A. 2005. Halotolerant and halophilic fungi. V: *Biodiversity of fungi: their role in human life*. Deshmukh S.K., Rai M.K. (eds.) Enfield, NH, Science Publishers: 69-127

Gunde-Cimerman N., Zalar P., Petrovič U., Turk M., Kogej T., Hoog G.S. de, Plemenitaš A. 2004. Fungi in the salterns. V: *Halophilic microorganisms*. Ventosa A. (ed.) Berlin, Springer-Verlag: 103-111

Gupta M., Gupta A.K. 2004. *In vitro* cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by aot/n-hexane micellar system. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 7, 1: 38-46

Hazel J.R., Williams E.E. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*, 29: 167-227

Hermanides-Nijhof E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 15: 141-177

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 2: 300-372

Hoog G. S. de, Yurlova N. A. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65: 41-54

Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 36: 245–252

Kandasamy P., Vemula M., Oh C.-S., Chellapa R., Martin C. E. 2004. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 35: 36586–36592

Kimoto T., Shibuya T., Shiobara S. 1997. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 323-329

Kimura Y., Sumiyoshi M., Suzuki T., Sakanaka M. 2006. Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight β -1,3-D-glucan (branch β -1,6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. *Anticancer Research*, 26, 6B: 4131-4141

Kogej T., Gostinčar C., Volkmann M., Gorbushina A.A., Gunde-Cimerman N. 2006. Mycosporines in extremophilic fungi - novel complementary osmolytes? *Environmental Chemistry*, 3: 105-110

Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 6600-6605

Kotar M. 2006. Poskusi s ponovitvami meritev na istem elementu. Študijsko gradivo (skripta) za predmet Statistične metode v ekologiji podiplomskega študija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Interno gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo: 18 str.

Kunz S. 2006. Fire blight control in organic fruit growing – systematic investigation of the mode of action of potential control agents. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 408: 249-253

Lanyi J. K. 1979. Physicochemical aspects of salt-dependence in halobacteria. V: *Strategies of microbial life in extreme environments: report of the Dahlem workshop on strategy of life in extreme environments*, Berlin, 20-24 november 1978. Shilo M. (ed.). Weinheim, Verlag Chemie: 93-107

Lateef A., Oloke J.K., Prapulla S.G. 2007. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1067–1070

Li H., Chi Z., Wang X., Duan X., Ma L., Gao L. 2007a. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1006–1012

Li H., Chi Z., Duan X., Wang L., Sheng J., Wu L. 2007b. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. *Process Biochemistry*, 42: 462–465

Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 169- 178

Liu X., Wang J., Gou P., Mao C., Zhu Z.-R. 2007. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 223–229

Liu Z., Chi Z., Wang L., Li J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 3: 445-451

Los D.A., Murata N. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1394: 3-15

Maathuis F.J.M., Amtmann A. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany*, 84: 123-133

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 991 str.

Madigan M.T., Oren A. 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 265-269

Martin C.E., Oh C.-S., Jiang Y. 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 271–285

Martin C. E., Oh C.-S., Kandasamy P., Chellapa R., Vemula M. 2002. Yeast desaturases. *Biochemical Society Transactions*, 30, 6: 1080-1082

Mounir R., Durieux A., Bodo E., Allard C., Simon J.-P., Achbani E.-H., El-Jaafari S, Douira A., Jijakli M.-H. 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters*, 29: 553–559

Ohta K., Moriyama S., Tanaka H., Shige T., Akimoto H. 2001. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 3: 262-270

Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 2: 334-348

Posas F., Chambers J.R., Heyman J.A., Hoeffler J.P., Nadal E. de, Arino J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 23: 17249-17255

Prasitchoke P., Kaneko Y., Bamba T., Fukusaki E., Kobayashi A., Harashima S. 2007. Identification and characterization of a very long-chain fatty acid elongase gene in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Gene*, 391: 16-25

Rand R.P., Parsegian V.A. 1989. Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 988: 351-376

Rep M., Krantz M., Thevelein J.M., Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 12: 8290-8300

Roermund C.V.T. van, Waterham H.R., Ijlst L., Wanders R.J.A. 2003. Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 1838-1851

Russell N.J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, 1: 93-113

Russell N.J., Evans R.I., Steeg P.F. ter, Hellemons J., Verheul A., Abee T. 1995. Membranes as a target to stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 255-261

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 2000. Introduction to food- and airborne fungi. 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 389 str.

Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F., Droby S. 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17: 189-199

Schneiter R., Tatzler V., Gogg G., Leitner E., Kohlwein S.D. 2000. Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1D9 to C16:1D11 fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182, 13: 3655-3660

Shanklin J., Cahoon E.B. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 611-641

Shin H.D., Yang K.J., Park B.R., Son C.W., Jang H.J., Ku S.K. 2007. Antiosteoporotic effect of Polycan, β -glucan from *Aureobasidium*, in ovariectomized osteoporotic mice. *Nutrition*, 23: 853-860

- Shiomi N., Yasuda T., Inoue Y., Kusumoto N., Iwasaki S., Katsuda T., Katoh S. 2004. Characteristics of neutralization of acids by newly isolated fungal cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 1: 54–58
- Singh R. S., Saini G. K., Kennedy J. F. 2008. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73, 4: 515-531
- Takeo K., Hoog G. S. de. 1991. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in ascomycetous black yeasts and related fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 60: 35-42
- Tamas M. J., Rep M., Thevelein J. M., Hohmann S. 2000. Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Letters*, 472: 159-165
- Tehlivets O., Scheuringer K., Kohlwein S.D. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 255–270
- Trotter P.J. 2001. The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition*, 21: 97-119
- Tunblad-Johansson I., Andre` L., Adler L. 1987. The sterol and phospholipid composition of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown at various concentrations of NaCl. *Biochimica et Biophysica Acta*, 921: 116-123
- Turk M., Mejanelle L., Šentjerc M., Grimalt J.O., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, 8: 53-61
- Turk M., Montiel V., Žigon D., Plemenitaš A., Ramos J. 2007. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology*, 153: 3586-3592
- Urzi C., Leo F. de, Passo C. lo, Criseo G. 1999. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, 36: 95-105
- Umezawa T., Mizuno K., Fujimura T. 2002. Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFLP. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1617–1625
- Valderrama M.J., Monteoliva-Sanchez M., Quesada E., Ramos-Cormenzana A. 1998. Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Research in Microbiology*, 149: 675-679

Voet D., Voet J. G. 2004. Biochemistry. 3rd ed. Hoboken, John Wiley & sons, Inc.: 1591 str.

Wong H., Anderson W. D., Cheng T., Riabowol K. T. 1994. Monitoring mRNA expression by polimerase chain reaction: the »primer-dropping« method. Analytical Biochemistry, 223: 251-258

Wongsumpanchai W., Anamnat S., Laoteng K., Petsom A. 2004. Elongation of C16:0 to C18:0 fatty acids in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS 1976 and fatty acid auxotrophic mutants. FEMS Microbiology Letters, 237: 213–218

Xu X.-Q., Beardall J. 1997. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an Antarctic hypersaline lake. Phytochemistry, 45, 4: 655-658

Yale J., Bohnert H.J. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. Journal of Biological Chemistry, 276, 19: 15996-16007

Yoshikawa J., Amachi S., Shinoyama H., Fujii T. 2007. Purification and some properties of β -fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103, 5: 491–493

Yoshikawa S., Mitsui N., Chikara K.I., Hashimoto H., Shimosaka M., Okazaki M. 1995. Effect of salt stress on plasma membrane permeability and lipid saturation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 80, 2: 131–135

Zalar P., Hoog G.S. de, Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. Studies in Mycology, 43: 38-48

Zalar P., Hoog G.S. de, Schroers H.-J., Frank J. M., Gunde-Cimerman N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). Antonie van Leeuwenhoek, 87: 311-328

ZAHVALA

V prvi vrsti gre zahvala moji mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman, ki je pri nas uveljavila raziskovanje ekstremofilnih gliv in s tem tudi meni omogočila delo na tem zanimivem področju.

Hvala recenzentki prof. dr. Ani Plemenitaš za zadnje popravke, ki so postavili piko na i končnemu izdelku.

Hvala somentorici dr. Martini Turk, ki mi je bila vedno na voljo za nasvet in mi je priskočila na pomoč tudi pri praktičnem delu, kadar dve roki nista bili dovolj.

Prav posebna hvala mojemu delovnemu mentorju Cenetu Gostinčarju, ki me je uvedel v laboratorijsko delo, me pri delu usmerjal in mi pomagal s praktičnimi napotki, mi svetoval pri statistični obdelavi podatkov, si vzel čas za prvo branje in popravo besedila in mi bil ob vsem tem ob hudih urah še v moralno oporo.

Največja zahvala pa gre mojim staršem, ki so mi stali ob strani vsa dolga leta študija in mi omogočili, da ga dokončam ob svojem času.

PRILOGA A

SEZNAMA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV, KI SMO JIH UPORABILI V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO

PRILOGA A1: Seznam začetnih oligonukleotidov, s katerimi smo namnožili dele genov, ki smo jim nato določali nukleotidno zaporedje.

Ime	nukleotidno zaporedje (5' - 3')	specifičnost
Hw-OLE1-F	TACACCGATACCGACAAGGACCCCTA	Del gena za
Hw-OLE1-R	GGAACCTCGTGGTGGGAAGTTGTGGTA	Δ^9 -desaturazo v <i>H.werneckii</i>
Hw-ODE12-F	CCATCAAGGAGATCCGTGATGCCAT	Del gena za
Hw-ODE12-R	ATGTTACCAGTGGCCTTGTGGTGCT	Δ^{12} -desaturazo v <i>H.werneckii</i>
HwFEN1-F	GTCATCTACTACATCATCATHTTYGGNGG	Del gena za elongazo v
HwFEN1-R	CGGGCGGACTGGAAGTAGTAVYARTACAT	<i>H.werneckii</i>
28S-F	GTAACGGCGAGTGAAGCGGC	Del gena za 28S rRNA
28S-R	CATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTC	(Rižner in sod. 2001)

PRILOGA A2: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v hkratni verižni reakciji s polimerazo.

Ime	nukleotidno zaporedje (5'-3')	specifičnost
ApOLE1-F	ATCTCCGACCTCACGACGAC	Del gena za Δ^9 -desaturazo v
ApOLE1-R	CTCACCGAGAGTGACGATGG	<i>A. pullulans</i>
ApODE12-F	CCGAGATACATTCCCTCGAC	Del gena za Δ^{12} -desaturazo v
ApODE12-R	CCATGAGAAGTAAGGGACAAGG	<i>A. pullulans</i>
ApELO1b-F	CGGACTGGAAGTAGTACCAGTAC	Del gena za elongazo v
ApELO1b-R	ACCGACAAGCTCGTTGTTCT	<i>A. pullulans</i>
Ap28-F	AAAGCTAGCCTTCGGGTTC	Del gena za 28S rRNA v
Ap28-R	CGGGATTCTCACCTCTATG	<i>A. pullulans</i>

PRILOGA B

DELNA ZAPOREDJA GENOV, KI SMO JIH IDENTIFICIRALI V RAZISKAVI

ApOLE1:

CATCTCCGACCTCACGACGACCCCGTTGTCGTCTGGCAGCACAGA ACTACCTC
AAGGTCGTTTTTCGGCATGGGTTTGATCTTCCCCACCCTCGTTGCCGGTCTCGGC
TGGGGTGACTGGCTCGGTGGTTTCATCTACGCTGGTATCCTCCGTATCTTCTTC
GTCCAGCAGGCCACCTTCTGTGTCAACTCCCTTGCCCACTGGCTCGGTGACCAG
CCTTTCGATGACCGCAACTCTCCTCGTGATCACGTCATCACCGCCATCGTCACT
CTCGGTGAGGGCTACCACA ACTTCCACCACGAGTT

ApODE12:

TCCCGAGATACATTCCCTCGACCCCGTTAGAGCTGGCCTCTGGGCTCTCTACA
CCGTCCTCCAGGGCCTGTTTCGCTACCGGCCTCTGGGTCATTGCCACGAGTGTG
GTCACCAGGCTTTCTCTCCCTCCAAGACCCTCAACGACACCGTCCGGCTGGGTCC
TCCACTCTGCTCTCCTTGTCCCTTACTTCTCATGGAAGATCTCCACGGCAAGC
ACCACAAGGCCACTGGTAA

ApELO1:

GCGGACTGGAAGTAGTACCAGTACATGACGACGTGGACGGTCAAGTTCAGGGT
AATGGGGACCCATGAGACTGCGGTGTGGCCGAGGAGCTGGGTGAAGCAGAGG
AGGGCGGTGGCACCGTGGTGGTAGGTGTGGAGGAAAGCTAGGAAATCAATTA
GCTGGCGCAATTGGCAATTGAGATTGATCTGTGCTTACTCAAGGGCTTCTTCTT
GAGGAAAAGGAAGCAGGTGTCAATCAGCTCGAGGTA CTTGGTGAGGTAGTTG
AGCTGCAATCTGTCAGTACGCGCGTCTCGTGGTTCGCGGATTCGGCGGAACATA
CGTAGTAAAGAACAACGAGCTTGTCCGGTCCAGCCACCCTCGTAGGCGCAGACA
GCGTGGAAGACGCCGTTTCTGACGAGCTCGGGCAGAAGCTGCTCGACGAACAA
AAGCAGGAGAAGACCACTGATCAGGGTCAGGTAGAGGTTGTGGACCTTGAAG
AAGAAGTTGAGCTTGAAGGGCTCGCGACCACGCATGAACTCTCTGCCGCCAAA
TATGATGATGTAGTAGATGAC

Ap28S rRNA:

TCTCGCCAATATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCCATTTAGAGCTGCATTC
CCAAACA ACTCGACTCGTCGAAGGAGATTTACATAGGGTGCCATTTCCCTGTCA
CATA CGGGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACTTAGACAGGC
GGCTTCCCCAAATCATCCTCTACAAATTACAATGCGAACC CGAAGGCTAGCTTT
CAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTTAC