

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Špela VOZEL

**VPLIV VISOKOAKTIVNEGA HUMANEGA
FRAGMENTA PFK-M (6-FOSFOFRUKTO-1-
KINAZE) NA METABOLIZEM PIVSKE KVASOVKE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Špela VOZEL

**VPLIV VISOKOAKTIVNEGA HUMANEGA FRAGMENTA PFK-M
(6-FOSFOFRUKTO-1-KINAZE) NA METABOLIZEM PIVSKE
KVASOVKE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF HUMAN HIGH-ACTIVE FRAGMENT PFK-M (6-
PHOSPHOFRUCTO-1-KINASE) ON METABOLISM OF BREWER'S
YEAST**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Raziskave, poskuse in analize podatkov sem opravljala v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu Ljubljana.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Matica Legišo, za recenzentko doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Matic Legiša
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

Članica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 5. 4. 2012

Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je elektronska oblika naloge identična tiskani verziji.

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Vozel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 582.282.23:579(043.2)=163.3
KG	pivska kvasovka/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /rak/Warburgov efekt/Crabtree efekt/ glukoza/etanol/glicerol/acetat/6-fosfofrukto-1-kinaza/apoptoza
AV	VOZEL, Špela
SA	LEGIŠA, matic (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	VPLIV VISOKOAKTIVNEGA HUMANEGA FRAGMENTA PFK-M (6-FOSFOFRUKTO-1-KINAZE) NA METABOLIZEM PIVSKE KVASOVKE
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XVI, 82 str., 17 pregl., 42 sl., 32 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Za rakaste celice je značilno, da porabljajo glukozo (Glk) hitreje kot normalne celice in jo ob prisotnosti kisika večino pretvorijo v laktat. Gre za t. i. Warburgov efekt. V diplomskem delu smo predstavili rezultate o vplivu humanega kratkega fragmenta mišičnega tipa encima 6-fosfofrukto-1-kinaze (kfPFK-M) na metabolizem pивske kvasovke v primerjavi z nativnim humanim encimom PFK1 (nPFK-M). Ugotavljali smo tudi, ali je izražanje gena za visokoaktivni kratki fragment PFK-M pri transformantah pивske kvasovke induciralo fiziološko stanje, podobno Warburgovemu efektu pri raku. Dokazali smo, da je aktivnost encima PFK pri obeh vrstah transformant s kfPFK-M in nPFK-M povečal aktivator fruktoza-2,6-bisfosfat. Preverili smo rast transformant na gojiščih z različnimi sladkorji in ugotovili, da sta obe vrsti najboljše rasli na gojišču z maltozo. Specifične produktivnosti zunajceličnih metabolitov so bile pri transformantah s kfPFK-M večje pri nižjih začetnih vrednostih Glk v gojišču, kar pomeni, da se je pojavil ojačan Crabtree učinek. Acetat je povzročil metabolični stres in sprožil odmiranje celic, zato celice s kfPFK-M niso rasle v gojišču z Glk, kar smo preverili spektrofotometrično. Pri transformantah z nPFK-M je bila rast dobra, Crabtree učinek se je vklopil pri 5 % Glk v gojišču. Pri transformantah s kfPFK-M nismo dokazali psevd-Warburgovega efekta.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 582.282.23:579(043.2)=163.3

CX brewer's yeast/*Saccharomyces cerevisiae*/cancer/Warburg effect/Crabtree effect/
glucose/ethanol/glycerol/acetate/6-phosphofructo-1-kinase/apoptosis

AU VOZEL, Špela

AA LEGIŠA, Matic (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2012

TI EFFECT OF HUMAN HIGH-ACTIVE FRAGMENT PFK-M (6-
PHOSPHOFRUCTO-1-KINASE) ON METABOLISM OF BREWER'S YEAST

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XVI, 82 p., 17 tab., 42 fig., 32 ref.

LA sl

AL sl/en

AB It is significant for cancer cells to use glucose more rapid than normal cells which transform glucose (Glc) into lactate in the presence of oxygen. This is called the Warburg effect. In our work we represented results of the impact of human short fragment muscle-type enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (kfPFK-M) on metabolism of brewer's yeast in comparison to native human enzyme PFK1 (nPFK-M). We tried to find out whether the expression of gene for high-active kfPFK-M in brewer's yeast induced physiological state similar to Warburg effect in cancer. We proved that the activity of PFK enzyme in both transformants with kfPFK-M and nPFK-M has been increased by activator fructose-2,6-bisphosphate. We examined growth of transformants on media with different sugars and found out that both types of transformants grew better on maltose. Specific production of extracellular metabolites were higher at lowest initial concentrations of Glc in media at kfPFK-M, suggesting that a strong Crabtree effect was triggered. Acetate caused the metabolic stress and triggered cells to die off. Consequently, transformants with kfPFK-M did not grow in glucose media as tested spectrophotometrically. The growth of transformants with nPFK-M was better and the Crabtree effect turned on at 5 % of Glc in media. We could not prove the presence of the pseudo-Warburg effect in kfPFK-M.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska infomacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo slik	X
	Okrajšave in simboli	XIII
	Slovarček	XVI
1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	RAK KOT BOLEZEN	2
2.2	METABOLIZEM PRI RAKU (WARBURGOV EFEKT)	4
2.2.1	6 – fosfofrukto-1-kinaza kot glavni regulatorni encim glikolize	5
2.2.1.1	Posttranslacijska modifikacija PFK1 pri tumorskih celicah	6
2.3	<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA ŠTUDIJO PRIMARNEGA METABOLIZMA	7
2.3.1	Pasteurjev efekt	8
2.3.2	Crabtree efekt	8
2.3.3	Celična smrt pri kvasovkah	9
2.3.3.1	Apoptoza	9
2.3.3.2	Indukcija apoptoze z acetatom, etanolom in glukozo	10
2.3.4	Uporabljeni sevi <i>S. cerevisiae</i>	11
2.3.4.1	Izhodni sev HD-56-5A	11
2.3.4.2	Gostiteljski sev HD-114-8D, z izbitimi nativnimi geni <i>pfk</i> , za vnos nativnega in modificiranega humanega gena <i>pfk-M</i>	11
2.3.4.3	Transformante seva HD-114-8D z rekombinantnima plazmidoma p416 GPD in p426 GPD	12
3	MATERIALI IN METODE	12
3.1	MATERIALI	12
3.1.1	Kemikalije	12
3.1.2	Laboratorijska oprema in potrošen material	14
3.1.3	Pufri	15

3.1.4	Uporabljeni plazmidi	16
3.1.5	Organizmi	17
3.1.5.1	Kvasni sevi	17
3.1.6	Gojišča za kvasovke	18
3.2	METODE	20
3.2.1	Sterilizacija gojišč, raztopin in steklovine	20
3.2.2	Gojenje kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	20
3.2.2.1	Priprava trdnega gojišča Sc-ura- z dodanim glicerolom in etanolom (Sc-ura-GE)	21
3.2.2.2	Priprava tekočega gojišča Sc-ura-GE za gojenje predstopnje rasti v manjših in večjih volumnih	21
3.2.2.3	Priprava tekočega gojišča z maltozo za predstopnjo rasti v večjem volumnu	22
3.2.2.4	Priprava tekočega gojišča Sc-ura- z dodano glukozo (Sc-ura-Glk) za različne analize	22
3.2.3	Spremljanje rasti kvasovk na različnih sladkorjih	22
3.2.3.1	Priprava trdnih gojišč Sc-ura- z dodanimi različnimi sladkorji	22
3.2.3.2	Aerobna in anaerobna inkubacija	23
3.2.4	Merjenje hitrosti rasti transformant <i>S. cerevisiae</i>	23
3.2.5	Merjenje encimske kinetike	23
3.2.5.1	Priprava vzorca	24
3.2.5.2	Merjenje aktivnosti	24
3.2.6	Merjenje vsebnosti zunajceličnih metabolitov	26
3.2.6.1	Določanje koncentracije acetata	27
3.2.6.1.1	Priprava vzorcev	27
3.2.6.1.2	Merjenje koncentracij acetata	28
3.2.6.2	Določanje koncentracije etanola	28
3.2.6.2.1	Priprava vzorcev	29
3.2.6.2.2	Merjenje koncentracije etanola	29
3.2.6.3	Določanje koncentracije glicerola	29
3.2.6.3.1	Priprava vzorcev	29
3.2.6.3.2	Merjenje koncentracije glicerola	30
3.2.7	Določanje viabilnosti kvasnih celic	30

3.2.7.1	Določanje viabilnosti z barvanjem z metilenskim modrilom	30
3.2.7.1.1	Priprava vzorcev	31
3.2.7.1.2	Določanje preživetja celic z barvilom metilen modro	31
3.2.7.2	Določanje viabilnosti s kompletom reagentov	32
3.2.7.2.1	Priprava vzorcev	32
3.2.7.2.2	Razločevanje živih celic od mrtvih s konfokalnim mikroskopom	32
4	REZULTATI	34
4.1	RAST TRANSFORMANT NA RAZLIČNIH SLADKORJIH	34
4.2	ENCIMSKA AKTIVNOST	37
4.3	IZBIRA GOJIŠČA ZA PRIPRAVO BIOMASE PRED TESTOM RASTI V GLUKOZNEM GOJIŠČU	37
4.3.1	Predstopnja rasti v gojišču z glicerolom in etanolom (Sc-ura-GE) in spremljanje preživetja celic	38
4.3.1.1	Rast transformant v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-GE	38
4.3.1.2	Preživetje celic v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-GE	39
4.3.1.2.1	Barvanje celic z metilenskim modrilom	39
4.3.1.3	Barvanje celic s kompletom reagentov FUN1	40
4.3.2	Predstopnja rasti v gojišču z 1 % maltozo (Sc-ura-malt 1 %) in spremljanje preživetja celic	41
4.3.2.1	Rast transformante kfPFK-M s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-malt 1 %	41
4.3.2.2	Preživetje celic v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-malt 1 %	42
4.4	PRIMERJAVA MED RASTJO CELIC IN VSEBNOSTJO ZUNAJCELIČNIH METABOLITOV V GOJIŠČIH Z URAVNANO IN NEURAVNANO VREDNOSTJO pH PRI TRANSFORMANTI kfPFK-M	42
4.4.1	Rast v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %, kjer je vrednost pH uravnana in neuravnana	43
4.4.2	Vsebnost zunajceličnih metabolitov v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % z uravnano in neuravnano vrednostjo pH pri transformanti kfPFK-M	44

4.5	PRODUKCIJA ZUNAJCELIČNIH METABOLITOV IN RAST TRANSFORMANT nPFK-M IN kfPFK-M NA ZAPUFRANEM GOJIŠČU SC-URA- GLK 2,5 %	48
4.5.1	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0)	48
4.5.2	Produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0)	49
4.6	PRODUKCIJA ZUNAJCELIČNIH METABOLITOV IN RAST TRANSFORMANT nPFK-M IN kfPFK-M PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH SLADKORJEV	54
4.6.1	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M ter produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanim 1 % glukoze	55
4.6.2	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M ter produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanimi 5 % glukoze	58
4.6.3	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M ter produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanimi 10 % glukoze	60
4.6.4	Ocena specifičnih hitrosti rasti in produktivnosti metabolitov pri 1 %, 2,5 %, 5 % in 10 % začetne koncentracije glukoze v gojiščih	64
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	67
5.1	RAZPRAVA	67
5.2	SKLEPI	74
6	POVZETEK	76
7	VIRI	79

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Encimi, kemikalije in komercialno dostopni kompleti.	12
Pregl. 2:	Laboratorijska oprema in potrošen material.	14
Pregl. 3:	Pufri za merjenje encimske kinetike.	15
Pregl. 4:	Pufri za uravnavanje vrednosti pH v gojiščih.	15
Pregl. 5:	Seznam uporabljenih plazmidov.	16
Pregl. 6:	Uporabljeni sevi kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	17
Pregl. 7:	Transformante seva HD-114-8D.	18
Pregl. 8:	Trdno gojišče Sc-ura- z dodanimi sladkorji (Sigma-Aldrich, 2010).	18
Pregl. 9:	Tekoče gojišče Sc-ura-GE za predstopnjo rasti.	18
Pregl. 10:	Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano maltozo za predstopnjo rasti.	19
Pregl. 11:	Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano glukozo za merjenje preživetja in vsebnosti zunajceličnih metabolitov.	19
Pregl. 12:	Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano glukozo in uravnano vrednostjo pH.	19
Pregl. 13:	Trdno gojišče Sc-ura-GE za rast sevov iz mikrobiološke zbirke.	20
Pregl. 14:	Reakcijska mešanica za merjenje encimske aktivnosti.	25
Pregl. 15:	Tipi sladkorjev (prirejeno po Berg in sod., 2002).	34
Pregl. 16:	Specifična hitrost rasti in specifična produktivnost transformante nPFK-M med rastjo v gojiščih z različno začetno koncentracijo glukoze.	64
Pregl. 17:	Specifična hitrost rasti in specifična produktivnost transformante kPFK-M med rastjo v gojiščih z različno začetno koncentracijo glukoze.	65

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Značilnosti rakastih celic (Prirejeno po: Hanahan in Weinberg, 2011: str. 658).	4
Sl. 2:	Poravnava N- in C-terminalnega dela človeške mišične PFK1 (prirejeno po Šmerc in sod., 2011: str. 11).	6
Sl. 3:	Plazmidna karta p416 (Mumberg in sod., 1995).	16
Sl. 4:	Plazmidna karta p426 (povzeto po Vector Database, Lab Life).	17
Sl. 5:	Potek encimske reakcije.	25
Sl. 6:	Umeritvena krivulja pri OD = 660 nm.	27
Sl. 7:	Potek reakcije porabe acetata in tvorbe NAD ⁺ .	28
Sl. 8:	Potek encimske reakcije pretvorbe etanola in nastanka NADH.	29
Sl. 9:	Potek encimske reakcije pretvorbe glicerola in nastanek NADH.	30
Sl. 10:	Prečni prerez objektnega stekla Thoma; Fein-Optik Jena.	31
Sl. 11:	Rast transformant na različnih sladkorjih v aerobnih pogojih.	35
Sl. 12:	Rast transformant na gojišču z maltozo, ki smo ga gojili v anaerobnih pogojih.	36
Sl. 13:	Encimska aktivnost nPFK-M in kfPFK-M.	37
Sl. 14:	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M po prenosu iz gojišča Sc-ura-GE v gojišče Sc-ura-Glk 2,5 %.	38
Sl. 15:	Preživetje celic transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %. Prikazani sta krivulji za delež živih celic transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v Sc-ura-GE.	39
Sl. 16:	Mrtve in žive celice, celice transformant nPFK-M in kfPFK-M po 4 urah opazovanja.	40
Sl. 17:	Rast transformante kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.	41
Sl. 18:	Preživetje celic transformante kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-malt 1 %. Prikazana je krivulja z deležem živih celic v 1 ml gojišča.	42
Sl. 19:	Rast transformante kfPFK-M v nezapufranem in zapufranem gojiščih Sc-ura-Glk 2,5 %.	43
Sl. 20:	Vsebnost etanola v gojišču pri transformanti kfPFK-M, ki smo jo gojili v nezapufranem in zapufranem gojiščih Sc-ura-Glk 2,5 %.	44

Sl. 21:	Vsebnost acetata v gojišču pri transformanti kfPFK-M, ki smo jo gojili v nezapufranem in zapufranem gojiščih Sc-ura-Glk 2,5 %.	45
Sl. 22:	Specifična produktivnost etanola pri transformanti kfPFK-M, ki je rasla na gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.	46
Sl. 23:	Specifična produktivnost acetata pri transformanti kfPFK-M, ki je rasla na gojišču Sc-ura- Glk 2,5 %.	47
Sl. 24:	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).	48
Sl. 25:	Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.	49
Sl. 26:	Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).	50
Sl. 27:	Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.	51
Sl. 28:	Specifična produktivnost etanola pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).	52
Sl. 29:	Specifična produktivnost acetata pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura- Glk 2,5 % (pH 7,0).	53
Sl. 30:	Specifična produktivnost glicerola pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).	54
Sl. 31:	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).	55
Sl. 32:	Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).	56
Sl. 33:	Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).	56
Sl. 34:	Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).	57
Sl. 35:	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).	58
Sl. 36:	Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).	59
Sl. 37:	Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).	59

Sl. 38:	Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).	60
Sl. 39:	Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).	61
Sl. 40:	Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).	62
Sl. 41:	Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).	63
Sl. 42:	Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).	64

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ADH	alkohol-dehidrogenaza
ADP	adenozin-5'-difosfat
ADP-GK	ADP-glukokinaza
AK	acetat-kinaza
Akt	serin/treonin-protein-kinaza
Al-DH	aldehid-dehidrogenaza
ATP	adenozin-3'-fosfat
c	koncentracija (»concentration«)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
celice HEK	humane embrionalne ledvične celice (»human embryonic kidney cells«)
CO ₂	ogljikov dioksid
dH ₂ O	destilirana voda
DK	dvojni »knockout«
D-LDH	D-laktat-dehidrogenaza
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (»deoxyribonucleic acid«)
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
F	faktor redčenja
F16bP	fruktoza-1,6-bisfosfat
F26bP	fruktoza-2,6-bisfosfat
F6P	fruktoza-6-fosfat
FUN1	barvilo za določanje viabilnosti
G6P-DH	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
GE	glicerol in etanol
GH	raztopina 2,5 % glukoze
GK	glicerol-kinaza
Glk	glukoza

GLUT1	glukozni transportni protein
GPД	glicerolfosfat-dehidrogenaza
HCl	vodikov klorid
KCl	kalijev klorid
kDa	kilo Dalton
kfPFK-M	kratki fragment mišičnega tipa encima 6-fosfofrukto-1-kinaze
M	molarnost (mol/l)
Malt	maltoza
MAP-kinaza	z mitogenom aktivirana protein-kinaza
MgCl ₂	magnezijev diklorid
mTOR	tarča za rapamicin pri sesalcih
NaCl	natrijev klorid
NAD ⁺	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
nPFK-M	nativni mišični tip encima 6-fosfofrukto-1-kinaze
p53	tumor supresorski protein
PCS	programirana celična smrt
PEG	polietilen glikol
PFK1	6-fosfofrukto-1-kinaza
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PK	piruvat-kinaza
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PTA	fosfotransacetilaza
RAS	protein, ki sodeluje v celični signalni transdukciji
RB	retinoblastom
RKZ	reaktivne kisikove zvrsti
RNA	ribonukleinska kislina (»ribonucleic acid«)
SICS	s sladkorjem inducirana celična smrt
TGF-β	tumorski rastni faktor
Tris	trihidroksimetil aminometan
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidni spekter

Δ	sprememba
λ	valovna dolžina
μ	mikro

SLOVARČEK

Glikoliza	je proces razgradnje glukoze v enostavnejše spojine. Ob tem se sprošča energija. Aerobna glikoliza poteka ob prisotnosti kisika, anaerobna glikoliza pa ob odsotnosti kisika.
Warburgov efekt	je značilen za rakaste celice. Le-te pretvarjajo glukozo pretežno v laktat, ki ga izločajo iz celic.
Crabtree efekt	Pri Crabtree efektu kvasovke (Crabtree pozitivni organizmi) prioritetno tvorijo etanol ob prisotnosti kisika in ob povišanih koncentracijah glukoze v okolici. Obenem gre za represijo respiracije na račun povečane stopnje aerobnega metabolizma, ko je prisotna visoka koncentracija glukoze v okolici (> 3 % glukoza).

1 UVOD

Rak spada med najbolj pogoste bolezni in je skupno ime za več kot dvesto malignih obolenj. Najpogostejši rak v Sloveniji je pri ženskah rak dojke in pri moških rak prostate. Stopnja obolevnosti se povečuje ne samo med odraslimi ampak tudi med otroki. Ob večanju incidence za pojav raka pa se povečuje tudi stopnja preživetja in ozdravitve zaradi uspešnih preventivnih testov ter uspešnejšega zdravljenja. Ena od bistvenih značilnosti rakastih celic je, da porabljajo glukozo mnogo hitreje od normalnih celic. Večinoma jo pretvorijo v laktat, ki ga izločajo iz celic. Pojav se imenuje Warburgov efekt. Pri rakastih celicah je metabolizem glikolize dereguliran in to zelo verjetno predvsem zaradi posttranslacijske modifikacije encima fosfofrukto-1-kinaze (PFK1). PFK1 je glavni regulatorni encim glikolize. PFK1 je iz štirih monomernih enot, ki tvorijo tetramer in s tem aktivno obliko encima. Aktivni center encima je na N-terminalnem delu, vezavno mesto za inhibicijo s citratom pa na N- in C-terminalnem delu. V procesu posttranslacijske modifikacije pride do proteolitične cepitve nativnega encima 85 kDa, tako da izgubi velik del C-terminusa. Pri tem nastane kratki fragment 47 kDa z neokrnjenim N-terminalnim delom, ki vsebuje aktivni center, vendar pa ima spremenjeno encimsko kinetiko. Kratki fragment ne vsebuje več alosteričnega vezavnega mesta za inhibitorni citrat. Fragment postane neobčutljiv za inhibicijo povratne zveze s citratom in ATP-jem, medtem ko nekateri aktivatorji, kot je fruktoza-2,6-bisfosfat, povečajo njegovo aktivnost bolj, kot pri nativnem encimu.

Rekombinantni aktivni kratki fragment lahko v celicah pripravimo tudi umetno z ekspresijo skrajšanega nativnega gena *pfk*. Uporaba skrajšanega gena *pfk*, ki kodira nastanek aktivnega humanega kratkega fragmenta, je priročno orodje za študij dereguliranega glikoliznega metabolizma, ki je značilen za Warburgov efekt. Kot gostiteljski sevi pa so primerni mutanti z izbitimi lastnimi geni *pfk*.

Pri diplomski nalogi smo uporabili za študij deregulirane glikolize kot modelni organizem kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki je najboljše proučen evkariontski organizem, predvsem dobro pa je poznana regulacija primarnega metabolizma.

NAMEN DELA: Namen diplomske naloge je bil proučiti vpliv humanega kratkega fragmenta mišičnega tipa PFK (PFK-M) na metabolizem pri kvasovki v primerjavi z nativnim humanim encimom PFK-M.

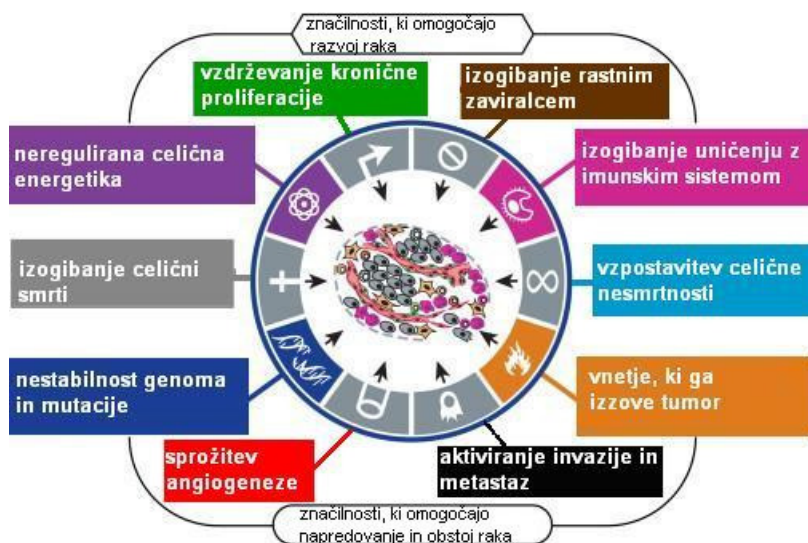
DELOVNA HIPOTEZA: Predvidevali smo, da modificiran PFK-M povzroči psevd-Warburgov efekt pri kvasovkah, ki se odraža z deregulirano glikolizo. Hkrati pa smo predpostavljali, da deregulirana glikoliza vpliva na kvasovko, predvsem na njeno rast in preživetje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK KOT BOLEZEN

Rak je v svetu zelo razširjena bolezen. V Evropi zboli za rakom približno 3,2 milijona ljudi na leto (Ferlay in sod., 2006), od tega v Sloveniji zboli letno več kot 10000 prebivalcev (Register raka..., 2008). Glavne biološke značilnosti rakastih celic so (Slika 1): neprestano razmnoževanje, zmožnost neskončnega podvojevanja, izogibanje rastnim zaviralcem, sprožitev angiogeneze, sposobnost razseljevanja in tvorbe metastaz, izogibanje celični smrti (Hanahan in Weinberg, 2000), izogibanje uničenju z imunskim sistemom, deregulirana energetika, nestabilnost genoma in mutacije ter vnetje, ki ga izzove tumor (Hanahan in Weinberg, 2011). V preglednem članku, ki sta ga napisala Hanahan in Weinberg (2011), so opisane glavne biološke značilnosti rakastih celic. Rakaste celice vzdržujejo kronično proliferacijo z deregulacijo signalnih poti, ki je v normalnih tkivih kontrolirana s tvorbo rastnih signalov. Celično nesmrtnost vzpostavijo s prisotnostjo telomeraze, ki je specializirana DNA polimeraza in dodaja ponovljene segmente na konce telomerne DNA. Tako ščiti telomerno DNA pred krajšanjem in celicam omogoča nesmrtnost. Poleg tega morajo rakaste celice zagotoviti učinkovit sistem za izogibanje rastnim zaviralcem, ki je odvisen od aktivnosti tumor supresorskih genov. Tumor supresorskih genov in poti, ki omejujejo celično rast in proliferacijo, je veliko. Primer: prototipska tumorska supresorja kodirata protein, povezan z retinoblastomom (RB), in protein TP53. Proteina delujeta kot centralni kontrolni točki med dvema ključnima celičnima regulatornima cikloma in odločata, ali se bo celica delila (odgovoren je RB) ali bo apoptotično propadla (odgovoren je TP53). Mutacije v funkciji teh proteinov povzročijo

nekontrolirano celično delitev in s tem tesno povezano izogibanje celični smrti. Programirano celično smrt, apoptozo, sprožijo različni tipi fiziološkega stresa, ki so jim rakaste celice izpostavljene tekom tumorigeneze. Najbolj pogosta strategija za omejitev apoptoze je izguba tumor supresorske funkcije proteina TP53, povečano nastajanje antiapoptotičnih regulatorjev (Bcl-2, Bcl-x_L) in signalov za preživetje (Igf1/2). Tudi genetsko poškodovane celice običajno propadejo v procesu apoptoze. Ker pa se rakaste celice izogibajo apoptozi, se mutacije hitro širijo. Mutacije in nestabilnost genoma sta nujna za napredovanje raka. Na napredovanje raka in tumorigenezo vpliva tudi s tumorjem izzvano vnetje. Vnetje je povezano z ostalimi značilnostmi raka in lahko vnaša v okolje bioaktivne molekule, ki sodelujejo pri ostalih značilnostih. Deluje v zgodnjih stadijih neoplazije in omogoča razvoj začetnih neoplazij v zrele tumorje. Ena izmed glavnih značilnosti raka je proces angiogeneze, kjer poteka tvorba novih žil, ki preskrbijo rakasta tkiva s hranili in kisikom ter odvajajo metabolne ostanke in CO₂. Angiogeneza se pojavi zgodaj v razvoju invazivnega raka. Preklop iz normalne fiziološke angiogeneze, ki se aktivira le začasno, na angiogenezo, ki je stalno aktivirana, se zgodi zaradi delovanja angiogenih regulatorjev. Le-ti so signalni proteini, ki se vežejo z receptorji na celični površini in sprožijo angiogenezo. Ožiljenje omogoča raku aktivno širjenje z metastazami. Aktivni invaziji raka v lokalno tkivo in ožiljenju sledi širjenje rakastih celic s krvjo in limfo, t. j. metastaziranje, in tvorba ter rast metastatskih lezij v oddaljenem tkivu. Med vodorom in širjenjem se rakaste celice uspešno izogibajo uničenju s strani imunskega sistema, saj uspešno onemogočajo komponente imunskega sistema. Rakaste celice lahko z izločanjem imunosupresivnih faktorjev (npr. TGF-β) na primer onesposobijo citotoksične limfocite T in naravne celice ubijalke ter se tako izognejo uničenju. Za rakaste celice je značilna tudi deregulacija energijskih procesov. Otto Warburg je že pred več kot 80. leti kot prvi opazil spremenjen metabolizem rakastih celic, to je aerobno glikolizo ob prisotnosti kisika namesto oksidativne fosforilacije. Tok glukoze v citoplazmo preko transporterjev GLUT1 in njena uporaba se poveča pri mnogih človekovih tipih raka. Aerobna glikoliza je povezana z aktivacijo onkogenov (npr. RAS) in mutiranih tumorskih zaviralcev (npr. TP53) (Hanahan in Weinberg, 2011).



Slika 1: Značilnosti rakastih celic (Prirejeno po: Hanahan in Weinberg, 2011: str. 658).

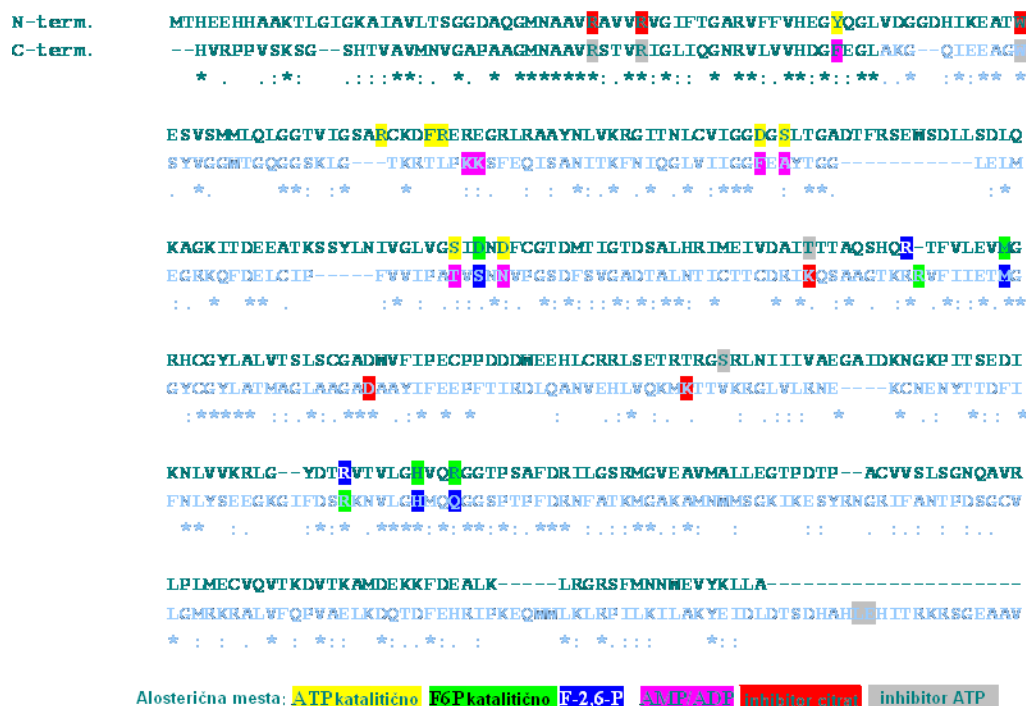
2.2 METABOLIZEM PRI RAKU (WARBURGOV EFEKT)

Spremenjen metabolizem v rakastih celicah omogoča hitro rast celic. Mnoge signalne poti, ki sodelujejo v delitvi celic, regulirajo tudi metabolne poti, pri katerih poteka izgradnja celici lastnih gradbenih elementov. Hitra rast rakastih celic je neodvisna od ravninskih faktorjev (Vander Heiden in sod., 2009). Onkogene spremembe povzročijo spremembo signalnih poti, povezanih z metabolizmom, kjer je najbolj pomembna onkogeni sprememba signalnih poti PI3K/Akt/mTOR, ki je v rakastih celicah konstitutivno aktivna (DeBerardinis in sod., 2008). Onkogene mutacije omogočajo rakastim celicam privzem hranil, predvsem glukoze, ki presegajo energetske potrebe za rast in delitev. Normalno diferencirane celice pridobivajo energijo, potrebno za celične procese, prek oksidativne fosforilacije v mitohondrijih. Rakaste celice tvorijo ATP pretežno v aerobni glikolizi. Ta fenomen se imenuje »Warburgov efekt«. Približno 85 % glukoze fermentirajo preko piruvata v laktat ne glede na to, ali je kisik prisoten ali ne. Aerobna glikoliza zagotavlja dovolj energije za celično proliferacijo. Pri tumorskih celicah, ki se nahajajo v večceličnem organizmu, viri hranil v okolici nikoli niso ovira, zato lahko vršijo metabolizem z aerobno glikolizo (Vander Heiden in sod., 2009).

2.2.1 6 – fosfofrukto-1-kinaza kot glavni regulatorni encim glikolize

Fosfofruktokinaza je tetramerni protein, torej iz štirih PFK podenot. Trije strukturni lokusi pri človeku kodirajo M (mišični), L (jetrni) in P (trombocitni) tip izoencima, ki se naključno združijo v homo- ali hetero-tetramerni holocim (Vora in sod., 1981). Encim 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1) sodeluje v primarnem metabolizmu in katalizira eno od treh ireverzibilnih korakov v glikolizi. Fosforilira fruktozo-6-fosfat, ki preide v fruktozo-1,6-bisfosfat (F16bP). Donor fosfata je Mg-ATP (Dunaway, 1983). Encim PFK1 je prisoten pri glivah, bakterijah in živalih, pri rastlinah pa prevladuje drug tip PFK1 in sicer pirofosfat odvisna oblika PFK1. PFK1 ima pomembno regulatorno vlogo pri glikolizi. Najbolj zahtevna regulacija poteka na nivoju PFK1. Gre za močno kontrolo encima PFK1 z inhibicijo povratne zveze. Pri zaviranju encimske aktivnosti PFK1 ima največjo vlogo citrat, ki je alosterični inhibitor. Aminokislinski ostanki, ki sodelujejo pri vezavi citrata na encim PFK1 pri evkariontih, so tako na N-terminalnem delu kot na C-terminalnem delu encima. Primerjava alosteričnih vezavnih mest med nižjimi in višjimi evkarionti pa je pokazala, da se je tekom evolucije pri sesalcih razvila najmočnejša inhibicija PFK1 s citratom (Usenik in Legiša, 2010). Inhibitor aktivnosti PFK1 je poleg citrata tudi ATP, medtem ko F26bP spodbuja aktivnost encima in zmanjša inhibicijo z ATP (Mlakar in Legiša, 2006).

Analize nukleotidnih sekvenc prokariontskih in evkariontskih encimov PFK1 so pokazale, da so se encimi tekom evolucije razvili s podvojitvijo in zlitjem prokariontskih predniških genov. N- in C-terminalni deli sesalske in prokariontske podenote kažejo homologije in imajo podobno 3-dimenzionalno konformacijo. Terciarno strukturo sesalske podenote PFK1 sestavljata dve domeni, ki sta po strukturi zelo podobni prokariontskemu monomeru (Poorman in sod., 1984). Poravnava N-in C-terminalnega dela človeške mišične PFK1 (Slika 2) kaže na homologije (označene z *), ki so dokaz, da sta se dva prokariontska gena zlila in so se mesta za vezavo citrata ohranila na N- in C-terminalnem delu. Po posttranslacijski modifikaciji PFK1 se del C-terminalnega dela proteolitično odcepi in nastane kratki fragment.



Slika 2: Poravnava N- in C-terminalnega dela človeške mišične PFK1 (prirejeno po Šmerc in sod., 2011: str. 11).

2.2.1.1 Posttranslacijska modifikacija PFK1 pri tumorskih celicah

Nativni encim PFK1 85-kDa, glavni regulatorni encim glikolize, je predmet posttranslacijske modifikacije. Po proteolitski cepitvi C-terminalnega dela encima nastane aktivni kratki fragment 47 kDa, ki je neobčutljiv na inhibicijo s citratom in ATP. Šmerc in sod. (2011) so odkrili, da so v tumorigenih celičnih linijah prisotni le kratki fragmenti in ni nativnih 85kDa encimov PFK1. Molekularsko maso aktivnega kratkega fragmenta PFK1 so določili z vstavitvijo skrajšanih genov, pripravljenih iz Cdna humanega mišičnega tipa PFK-M. Skrajšane gene različnih dolžin so vstavili v sev *E. coli* z izbitimi lastnimi geni za sintezo PFK1. Transformante *E.coli*, ki so kodirale aktivna kratka fragmenta z molekularno maso 45,551 kDa in 47,835 kDa, so rasle v gojišču z glukozo. Oba kratka fragmenta sta bila neobčutljiva na inhibicijo s citratom in ATP. Kinetika katalize z nativnim encimom in kratkimi fragmenti se je razlikovala. Aktivnost nativnega encima PFK1 je upadla pri koncentracijah citrata nad 0,6 Mm, medtem ko citrat ni inhibiral aktivnosti krajšega encima. Prav tako ga ni inhibiral laktat, ki zmanjša aktivnost nativnih PFK1. Aktivator

F26Bp je povečal afiniteto pri kratkem in nativnem encimu. F26Bp je občutno povečala maksimalno hitrost $V_{\max}$ pri kratkem fragmentu encima, vendar ne pri nativnem proteinu. Skrajšan humani gen *pfkM*, ki je bil vstavljen v stabilne netumorigene celice HEK, je stimuliral izločanje laktata in porabo glukoze. Glede na svoje kinetične lastnosti, bi kratki fragmenti lahko imeli pomembno vlogo pri ojačanju glikolitičnega toka. Posttranslacijska modifikacija encima PFK1 naj bi bila ključni faktor deregulirane glikolize v tumorjih, ki v kombinaciji s spremenjenim mehanizmom signaliziranja omogoča hitro proliferacijo tumorskih celic (Šmerc in sod., 2011).

2.3 *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM ZA ŠTUDIJO PRIMARNEGA METABOLIZMA

S. cerevisiae je zelo raziskan mikroorganizem in je eden najbolj pogosto uporabljenih evkariontskih modelnih organizmov. Je model tudi za neglivne organizme, kot so živali vključno s človekom. Uporablja se za študije staranja, regulacije genske ekspresije, signalne transdukcije, celičnega cikla, metabolizma, apoptoze, nevrodegenerativnih motenj in drugih bioloških procesov (Karathia in sod., 2011).

S. cerevisiae spada v podred Ascomycotina. Kvasovke so enocelični organizmi, ki se razmnožujejo vegetativno z brstenjem ali fizijo (zlivanjem). So splošno razširjene in striktno kemoorganotrofne. Za rast potrebujejo ogljik v organski obliki (npr. v obliki sladkorjev). V naravi se širijo s prenašalci (aerosoli, veter, človeški in živalski prenašalci), ker so negibljive. Kvasovke so po obliki lahko elipsoidne (*Saccharomyces* spp.), cilindrične, ovalne, trikotne, filamentozne, okrogle ali podaljšane. Mnoge so polimorfne oblike in se pod spremenjenimi pogoji v okolju spremenijo v filamentozne oblike. Mnoge so tudi pigmentirane. Imajo notranje celične strukture kot ostali evkarionti. Celice so obdane s plazmalemo, periplazmo in celično steno (Walker, 1998).

S. cerevisiae v različnih pogojih izloča različne metabolite. Etanol izloča v procesu alkoholne fermentacije glukoze. Če je glukoze v mediju malo, se pod aerobnimi pogoji ne bo vršila alkoholna fermentacija. Ob višku glukoze se v aerobnih pogojih takoj začne alkoholna fermentacija, ker je stopnja privzema glukoze večja od možnosti porabe v

respiratorni poti (Van Urk in sod., 1988). Sposobnost kvasovk, da vršijo alkoholno fermentacijo pri aerobnih pogojih ob prisotnosti glukoze, se imenuje Crabtree efekt. (Piškur, 2006) V začetnih korakih glikolize se pri fosforilaciji glukoze tvori NADH, ki aktivira produkcijo etanola v kasnejši fazi. Etanol se tvori z redukcijo acetaldehida s pomočjo encima alkoholne dehidrogenaze, ki je odvisna od NADH. Tvori se tudi glicerol. Glicerol deluje kot zaloga ogljikovih hidratov v celici. Je glavni osmolit v celici. Povečuje turgorski tlak in tako olajša tvorbo brstov (Xu in Tsurugi, 2006). Iz celice se izloča tudi acetat, ki je produkt metabolizma pri *S. cerevisiae*. Acetat se ob močni glikolizi sprošča iz celice in tako prepreči metabolni stres. V celici disociira. Če je zunajcelična vrednost P_h nižja od znotrajcelične, potem acetat zakisa znotrajcelični prostor, akumulirajo se protoni in pride do inhibicije metabolizma (Ludovico in sod., 2001). M. E. Pampulha in V. Loureiro (1989) navajata, da je acetat bolj toksičen v kombinaciji z etanolom. Opazili so, da je vpliv acetata na metabolizem ob višjih koncentracijah etanola bolj izrazit v zadnjih korakih metabolizma (Pampulha in Loureiro, 1989).

2.3.1 Pasteurjev efekt

Pasteurjev efekt je definiran kot inhibicija alkoholne fermentacije ob prisotnosti kisika. Pojavi se pri vseh fakultativnih fermentativnih kvasovkah, ki ne kažejo Crabtree efekta. Pri *S. cerevisiae* se pojavi le pri počasi rastočih celicah, ko je tudi glikolitični pretok nizek (Pronk in sod., 1996). Po mnenju Sticklanda (1955) poteka v dveh delih. Prisotnost kisika lahko delno ali popolnoma zavre tvorbo produktov anaerobnega razpada ogljikovih hidratov (npr. glukoze). Lahko pa kisik le zmanjša stopnjo razpada ogljikovih hidratov (Stickland, 1955). Pri visokih koncentracijah glukoze Pasteurjev efekt nima vpliva, saj pri teh pogojih poteka le fermentacija. Temu efektu pravimo Crabtree efekt, ki je definiran obratno kot Pasteurjev efekt (De Deken, 1966).

2.3.2 Crabtree efekt

Pri Crabtree efektu gre za represijo sinteze respiratornih encimov (citokromov a, b, c) ob povečani stopnji aerobnega metabolizma, ko je prisotna visoka koncentracija glukoze v mediju. Gre za proces alkoholne fermentacije ob prisotnosti kisika v primeru, ko je mogoča visoka rastna hitrost (Diaz-Ruiz in sod., 2008). Lemoigne (1954) je preučeval rast

kvasovk v aerobnih pogojih in ugotovil, da se diauksična rast pojavi ob prisotnosti večjih koncentracij glukoze. Hitri rasti, ki vključuje aeroben metabolizem, sledi počasna rast s kopičenjem etanola. Ko se povečuje koncentracija glukoze (več kot 6 Mm), se povečuje tudi stopnja aerobnega metabolizma in se vključi Crabtree efekt. Crabtree pozitivni organizmi, kamor spada *S. cerevisiae*, prioritetno uporabljajo fermentacijo ob prisotnosti kisika, Crabtree negativni organizmi (npr. *Candida tropicalis*) pa ne fermentirajo v aerobnih pogojih (De Deken, 1966). Diaz-Ruiz in sod. (2008) navajajo, da nizke koncentracije glukoze-6-fosfat in fruktoze-6-fosfat spodbujajo respiratorni tok, medtem ko je ta proces močno inhibiran s povečano koncentracijo fruktoze-1,6-bisfosfata (F16Bp). Gre za inhibicijo oksidativne fosforilacije s F16Bp v mitohondrijih Crabtree pozitivnih kvasovk. F16Bp zniža stopnjo respiracije v mitohondrijih pri fiziološki koncentraciji (2-10 Mm) med prehodom na fermentativni tip metabolizma pri pojavu Crabtree efekta. F16Bp deluje neposredno na dva kompleksa v mitohondrijski dihalni verigi. Močno inhibira citokrom c-oksireduktazo (kompleks III) in citokrom c-oksidozo (kompleks IV) (Diaz-Ruiz in sod., 2008).

2.3.3 Celična smrt pri kvasovkah

Celično smrt v grobem delimo na apoptozo in nekrozo. Nekroza je nekontrolirana celična smrt, ki poteka burno in ima hude negativne posledice za organizem ter okolico. Povzroča vnetni proces. Apoptoza pa je kontrolirana celična smrt, pri kateri se celica kontrolirano razgradi, kar ni moteče za okoliške celice. Programirana celična smrt (PCS) pri kvasovkah lahko poteka po različnih mehanizmi: kot apoptoza (od kaspaz odvisna ali neodvisna), apoptozi podobna PCS, nekroza, nekrozi podobna PCS, naključna nekroza, avtofagična in mitotična smrt (Gourlay in sod., 2006).

2.3.3.1 Apoptoza

Apoptozo pri kvasovkah sprožijo številne napake v genih ali pri celičnih procesih. Gourlay in sod. (2006) navajajo, da nepravilnosti pri N-glikozilaciji in odsotnost obrambnega proteina pred apoptozo (Ost2p) vodijo do apoptoze neodvisne od kaspaz. Pogoste so tudi mutacije v genih, ki sodelujejo v celičnem ciklusu. Med omenjene spadajo mutacije gena *pds5* in *cdc48* (Costa in Moradas-Ferreira, 2001), ki sodelujeta v celičnem ciklu. Apoptozo

lahko sprožijo tudi zunajcelični dejavniki. Le-ti so vodikov peroksid, acetat, hiperozmotski stres, UV sevanje, feromoni, pomanjkanje aminokislin in aspirin. PCS regulira populacijo celic glede na stanje v okolju. Prenos signala v celico poteka pri kvasovkah po dveh signalnih poteh: po Ras poti in MAP-kinazni poti. Pri uravnavanju celične rasti, kot odgovor na zunanje dražljaje, ima vlogo Ras signalna pot. Signalna kaskada sproži tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ) in posledično celično smrt (Gourlay in sod., 2006). RKZ nastajajo v mitohondrijih in so normalno prisotni v celici. Kopičenje RKZ v celici vodi v oksidativni stres, saj nivo RKZ pod stresnimi pogoji preseže antioksidativno sposobnost celice. Akumulacija oksidiranih molekul je povezana s celično smrtjo (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.3.3.2 Indukcija apoptoze z acetatom, etanolom in glukozo

Acetat je eden od metabolitov, ki jih celica lahko izloča v okolje. Acetat pod določenimi pogoji zmanjša preživetje celic. Ludovico in sod. (2001) so raziskovali, kakšno je preživetje celic po 200-minutni izpostavitvi različnim koncentracijam acetata (20-200 Mm). Izpostavitve acetatu je vodila v celično smrt. Pri celicah, tretiranih z 20-80 Mm acetatom, je kromatin kondenziral, kar je značilno za apoptozo. Pri tretiranju s 120 Mm in 160 Mm acetatom pa se je pojavila nekroza z uničenimi znotrajceličnimi strukturami. V zgodnji fazi apoptoze se na zunanjem delu plazmaleme izpostavi fosfatidil serin, ki je značilen pokazatelj apoptoze. Le-ta se je izpostavil pri tretiranju s 40-80 Mm acetatom, kjer je prišlo tudi do prelomov molekul DNA, značilnih za apoptozo.

Etanol je najpomembnejši produkt fermentacije. Etanol vpliva na celico na različne načine. Spremeni fluidnost membrane, strukturo proteinov in izstop Mrna iz jedra ter vklopi stresni odgovor. Lahko povzroči PCS, kjer pride do kondenzacije in razpada kromatina ter do razpada mitohondrijev. Kitagaki in sod. (2007) so raziskovali vpliv etanola na kvasne celice. Pri celicah, tretiranih s 23 % etanolom, je prevladovala apoptoza nad nekrozo. Prišlo je do kondenzacije in fragmentacije kromatina kot pri apoptozi, inducirani z acetatom. Odkrili so, da mitohondrijski fizijski protein Fis1 zmanjša tvorbo RKZ ter tako inhibira apoptozo, inducirano z etanolom.

Glukoza deluje za celice kot hitri vir hrane. Če je glukoza prisotna v okolici, celice najprej privzamejo glukozo in jo metabolizirajo. Vendar glukoza v visokih koncentracijah posredno prek aktivacije signalnih poti zmanjša privzem ostalih ogljikovih hidratov, zmanjša dihanje in celica izgubi odpornost na stres (Verstrepen in sod., 2004). Lee in sod. (2011) so ugotovili, da do celične smrti, ki jo povzroča glukoza (SICS), pride zaradi odpovedi Crabtree efekta, kjer glukoza običajno inhibira respiracijo in pridobivanje energije v obliki ATP preko oksidativne fosforilacije. Vzrok za porušitev Crabtree efekta je tudi nizka vsebnost fruktoze-1,6-bisfosfata (F16Bp). F16Bp zmanjša porabo kisika v mitohondrijih pri Crabtree-pozitivnih kvasovkah. Običajno F16Bp zavre respiracijo in oksidativno fosforilacijo ter tako prepreči celično smrt, ki bi jo povzročile reaktivne kisikove zvrsti (RKZ). Ponovna vzpostavitev Crabtree efekta ščiti celice pred SICS. V omenjeni raziskavi so dokazali, da anorganski fosfat in sukcinat z različnim mehanizmom ščitita celice pred SICS.

2.3.4 Uporabljeni sevi *S. cerevisiae*

Pri diplomskem delu smo uporabljali različne seve *S. cerevisiae*.

2.3.4.1 Izhodni sev HD-56-5A

Izhodni sev *S. cerevisiae* HD-56-5A je avksotrof, za svojo rast potrebuje nukleotid uracil in vsebuje vse nativne gene *pfk* za nativne encime PFK (Raben in sod., 1995).

2.3.4.2 Gostiteljski sev HD-114-8D, z izbitimi nativnimi geni *pfk*, za vnos nativnega in modificiranega humanega gena *pfk-M*

Gostiteljski sev HD-114-8D izvira iz seva HD-56-5A in ima izbita oba gena za nativne encime PFK. To sta gena *pfkA* in *pfkB*. Tak sev ne more rasti na glukozni, raste pa na gojišču z glicerolom in etanolom. Raben in sod. (1995) so ga uporabili za pripravo transformant z želenimi geni za encime PFK.

2.3.4.3 Transformante seva HD-114-8D z rekombinantnima plazmidoma p416 GPD in p426 GPD

Obstaja serija vektorjev za učinkovito kloniranje genov in za njihovo kontrolirano ekspresijo na različnih nivojih. Nivoje ekspresije lahko kontroliramo z uporabo različnih primerjev ali števila kopij rekombinantnega gena. Plazmid p416 je centromerni CEN/ARS plazmid in v celicah nastopa v majhnem številu kopij. Plazmid p426 je 2 μ plazmid in vsebuje veliko število rekombinantnih kopij gena. Transformante so bile pripravljene tako, da so v sev HD-114-8D vnesli plazmida p416 in p426 s promotorjem GPD z insertoma z nativnim humanim genom *pfk*-M in modificiranim humanim genom *pfk*-M, ki nosi zapis za kratki fragment 47 kDa. Oba plazmida vsebujeta poleg inserta, mesta *ori*, restrikcijskih mest, terminatorja in promotorja GPD tudi komplementacijo z URA3, ki omogoča, da transformirane celice same sintetizirajo uracil. Vektorji, ki vsebujejo promotor GPD, so zelo učinkoviti v ekspresiji heterolognih genov (Mumberg in sod., 1995). Nativni promotor GPD omogoča izražanje gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GPD) in pri kvasovkah ga močno inducira prisotnost glukoze. To so ugotovili z uporabo reporterskih genov, ki so se pod vplivom z glukozo induciranega promotorja GPD močno izražali (Holland M.J. in Holland J.P., 1979).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Encimi, kemikalije in komercialno dostopni kompleti.

Proizvajalec	Kemikalije in komercialno dostopni kompleti
Invitrogen (Carlsbad, Kalifornija)	kloramfenikol, streptomicin
	se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 1: Encimi, kemikalije in komercialno dostopni kompleti

Proizvajalec	Kemikalije in komercialno dostopni kompleti
Megazyme (Bray, Irska)	komplet reagentov za določanje koncentracije acetata ACETIC ACID, komplet reagentov za določanje koncentracije etanola ETHANOL, komplet reagentov za določanje koncentracije glicerola GLYCEROL GK
Merck (Darmstadt, Nemčija)	agar, etanol, NaCl, NaOH
Messer Slovenija (Ruše pri Mariboru, Slovenija)	tekoči dušik
Molecular probes Europe BV (Leiden, Nizozemska)	komplet za testiranje preživetja pri kvasovkah (LIVE/DEAD Yeast Viability Kit)
Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)	aldolaza, amon sulfat, ATP, dekstrin, barvilo metilen modro, benzamidin, DTE, DTT, dušikove baze brez aminokislin, EDTA, fruktoza, fruktoza-6-fosfat, fruktoza-2,6-bisfosfat (F26bP), glicerol, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, glukoza, HCl, HEPES, KCl, kvasni sintetični nadomestek medija brez uracila, maltoza, manoza, MgCl ₂ , Na-citrat, NADH, PEG 6000, PMSF, saharoza, trioza-fosfat izomeraza.
BioRad (Hercules, Kalifornija)	BioRad Protein Assay

3.1.2 Laboratorijska oprema in potrošen material

Preglednica 2: Laboratorijska oprema in potrošen material.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema in potrošeni material
Eppendorf (Hamburg, Nemčija)	avtomatske pipete, centrifuga 5415R, magnetno mešalo, namizna centrifuga MiniSpin, nastavki za pipete z membrano
Gilson (Middleton, Združene države Amerike)	avtomatske pipete
Gorenje (Velenje, Slovenija)	mikrovalovna pečica
Hettich (Tuttlngen, Nemčija)	centrifuga Universal 320R
IKA (Žiri, Slovenija)	magnetno mešalo
Iskra PIO d.o.o. (Šentjerneј, Slovenija)	biološka brezprašna komora
Kambič (Semič, Slovenija)	parni sterilizator A-500/700, stresalnik za kulture mikroorganizmov, inkubator za kulture mikroorganizmov
Lauda (Lauda-Königshofen, Nemčija)	termoblok RE104, termostatska vodna kopel
Leica (Mennheim, Nemčija)	konfokalni mikroskop
Millipore (Billerica, Massachusetts)	komplet za filtriranje
Perkin Elmer (Boston, MA)	UV/VIS spektrofotometer Lambda 25
Sarstedt (Nümbrecht, Nemčija)	centrifugirke, falkonke, nastavki za avtomatske pipete
Sartorius AG (Gottingen, Nemčija)	filtri s premerom 0,2 µm in 0,45 µm, komplet za filtriranje, Micro-Dismembrator
Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)	posoda za anaerobno gojenje celičnih kultur
Tehtnica Železniki (Železniki, Slovenija)	tehtnica ET-1111
Thoma Fein-Optik (Bad Blankenburg, Nemčija)	objektno stekelce z merilom za štetje celic Fein-Optik Jena

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 2: Laboratorijska oprema in potrošeni material.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema in potrošeni material
TPP (Trasadingen, Švica)	plastični laboratorijski material za delo s celičnimi kulturami (centrifugirke, filtri za sterilno filtracijo, nastavki za avtomatske pipete za večje volumne, plošče za gojišča) pH meter
Wild (Heerbrugg, Švica)	svetlobni mikroskop

3.1.3 Pufri

Preglednica 3: Pufri za merjenje encimske kinetike.

Pufer	Sestava
Pufer za merjenje encimske aktivnosti	100 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , 200 mM KCl, 2 mM DTT, 10 % (w/v) PEG 6000, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, pH 7,5
Pufer za spiranje celic	100 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , 200 mM KCl, 50 % (w/v) PEG 6000, 2 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, pH 7,5
Ekstrakcijski pufer	500 µl pufra za merjenje encimske aktivnosti, 480 µl 10 % (w/v) PEG 6000, 10 µl 500 mM F-6-P

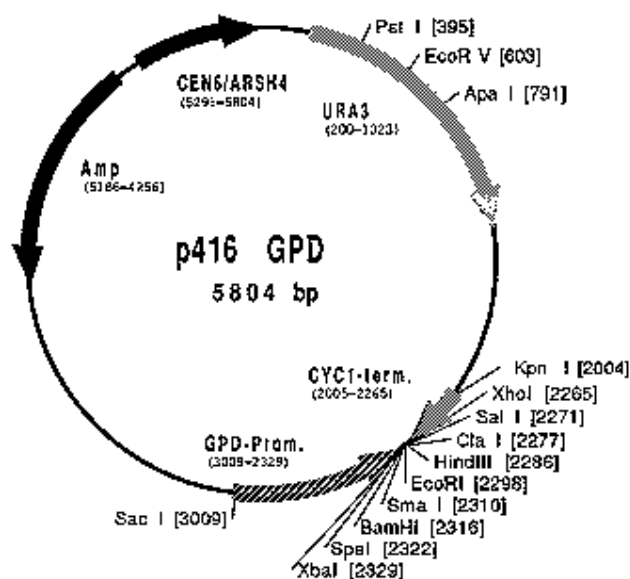
Preglednica 4: Pufri za uravnavanje vrednosti pH v gojiščih.

Pufer	Sestava
0,1 M HEPES	0,1 M HEPES pH 7,2

3.1.4 Uporabljeni plazmidi

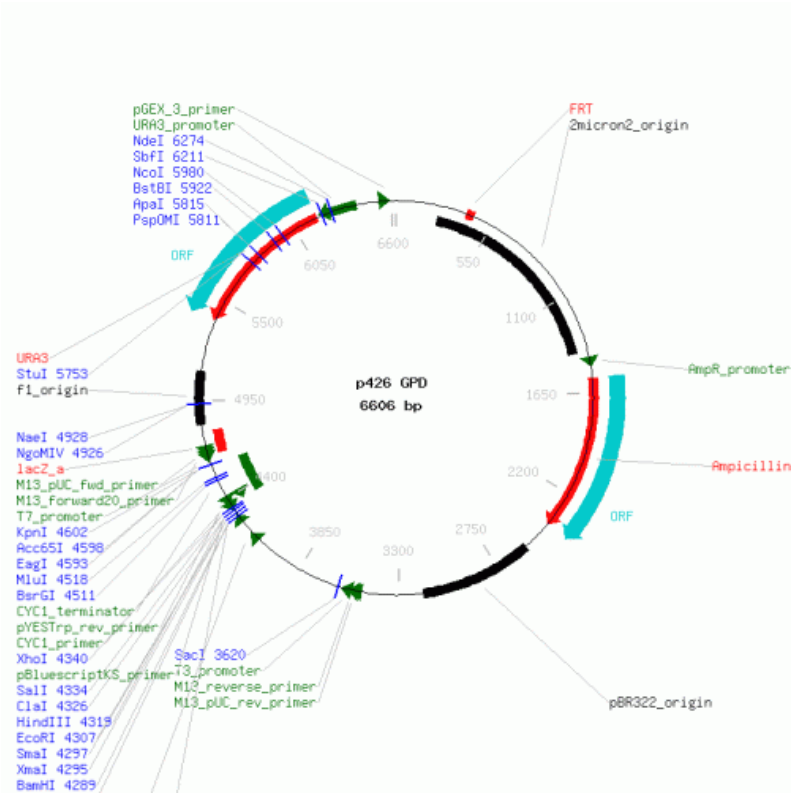
Preglednica 5: Seznam uporabljenih plazmidov.

Plazmid
p416 GPD
p426 GPD



Slika 3: Plazmidna karta p416 (Mumberg in sod., 1995: str. 120).

Plazmid p416GPD je ekspresijski vektor z majhnim številom kopij rekombinantnih genov in vsebuje signale za transkripcijo in translacijo. Fragmente cDNA nhPFK-M in fragment 9 hPFK-M so vstavili pred promotor GPD plazmida (Mumberg in sod., 1995).



Slika 4: Plazmidna karta p426 (povzeto po Vector Database, Lab Life).

Plazmid p426GPD, z velikim številom kopij genov, je prav tako kot p416GPD ekspresijski vektor s signali za izražanje genov in vivo ali in vitro.

3.1.5 Organizmi

3.1.5.1 Kvasni sevi

Preglednica 6: Uporabljeni sevi kvasovke *S. cerevisiae*.

Sev	Oznaka	Vir
HD-114-8D	Dvojni <i>pfkA/pfkB</i> knockout (DK)	mikrobiološka zbirka na Kemijskem inštitutu Ljubljana (Raben in sod., 1995)

Preglednica 7: Transformante seva HD-114-8D.

Zaporedna številka	Plazmid	Promotor	Insert
5	P416	GPD	nhp <i>pfk</i> M <i>Homo sapiens</i>
6	P426	GPD	nhp <i>pfk</i> M <i>Homo sapiens</i>
7	P416	GPD	hp <i>pfk</i> M frg.9 <i>Homo sapiens</i>
8	P426	GPD	hp <i>pfk</i> M frg.9 <i>Homo sapiens</i>

3.1.6 Gojišča za kvasovke

Kvasovke *S. cerevisiae* smo gojili v definiranih sintetičnih gojiščih (Sc). Za vzdrževanje selekcijskega pritiska smo uporabili gojišče brez uracila (Sc-ura-).

Preglednica 8: Trdno gojišče Sc-ura- z dodanimi sladkorji (Sigma-Aldrich, 2010).

Sestavina	Količina
gojišče Sc-ura- (yeast synthetic dropout media supplement without uracil)	1,92 g/l
različni sladkorji (dekstrin, fruktoza, glukoza, maltoza, manoza)	10 g/l
dušikove baze brez aminokislin (YNB) z dodanim amonijevim sulfatom	1,7 g/l
	5 g/l
agar	15 g/l

Preglednica 9: Tekoče gojišče Sc-ura-GE za predstopnjo rasti.

Sestavina	Količina
gojišče Sc-ura- (yeast synthetic dropout media supplement without uracil)	1,92 g/l

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 9: Tekoče gojišče Sc-ura-GE za predstopnjo rasti.

Sestavina	Količina
dušikove baze brez aminokislin (YNB) z	1,7 g/l
dodanim amonijevim sulfatom	5 g/l
glicerol	20 g/l
etanol	20 ml/l

Preglednica 10: Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano maltozo za predstopnjo rasti.

Sestavina	Količina
gojišče Sc-ura- (yeast synthetic dropout media supplement without uracil)	1,92 g/l
dušikove baze brez aminokislin (YNB) z	1,7 g/l
dodanim amonijevim sulfatom	5 g/l
maltoza	10 g/l

Preglednica 11: Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano glukozo za merjenje preživetja in vsebnosti zunajceličnih metabolitov.

Sestavina	Količina
gojišče Sc-ura- (yeast synthetic dropout media supplement without uracil)	1,92 g/l
dušikove baze brez aminokislin (YNB) z	1,7 g/l
dodanim amonijevim sulfatom	5 g/l
glukoza	10, 25, 50, 100 g/l

Preglednica 12: Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano glukozo in uravnano vrednostjo pH.

Sestavina	Količina
gojišče Sc-ura- (yeast synthetic dropout media supplement without uracil)	1,92 g/l
dušikove baze brez aminokislin (YNB) z	1,7 g/l
dodanim amonijevim sulfatom	5 g/l

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 12: Tekoče gojišče Sc-ura- z dodano glukozo in uravnano vrednostjo pH

Sestavina	Količina
glukoza	25 g/l
pufer 0,1 M HEPES	100 ml/l

Preglednica 13: Trdno gojišče Sc-ura-GE za rast sevov iz mikrobiološke zbirke

Sestavina	Količina
gojišče Sc-ura- (yeast synthetic dropout media supplement without uracil, Sigma)	1,92 g/l
dušikove baze brez aminokislin (YNB) z	1,7 g/l
dodanim amonijevim sulfatom	5 g/l
glicerol	20 g/l
etanol	20 ml/l
agar	15 g/l

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija gojišč, raztopin in steklovine

Gojišča in steklovino, ki smo jih uporabljali za gojenje kvasnih celic *S. cerevisiae*, smo predhodno sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto (20 min, 121°C, $1,2 \times 10^5$ Pa). YNB z amonijevim sulfatom in pufre, ki so občutljivi na visoke temperature, smo sterilizirali s filtracijo skozi filter s premerom por 0,2 µm.

3.2.2 Gojenje kvasovk *S. cerevisiae*

Sevi kvasovke *S. cerevisiae* HD-114-8D s plazmidom p416GPD z različnima insertoma *nhpfk-M* in *hpfk-M* frg. 9, ki smo jih uporabljali pri diplomski nalogi, izvirajo iz mikrobiološke zbirke na Kemijskem inštitutu Ljubljana.

3.2.2.1 Priprava trdnega gojišča Sc-ura- z dodanim glicerolom in etanolom (Sc-ura-GE)

Pri delu s kvasnimi kulturami smo uporabljali različna trdna gojišča Sc-ura-. Vsem je skupna osnovna sestava gojišč, ki ne vsebujejo nukleotida uracil, saj jo uporabljene transformante *S. cerevisiae* sintetizirajo same, izhodni sevi pa so avksotrofni mutanti, ki uracila ne morejo sintetizirati sami. Za precepljanje kultur iz mikrobiološke zbirke smo uporabljali trdno gojišče Sc-ura-GE z dodanim glicerolom in etanolom, ki sta bila nefermentativna vira ogljikovih hidratov. V destilirani vodi smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili sintetični kvasni nadomestek brez uracila (yeast synthetic dropout media supplement without uracil) s končno koncentracijo 1,92 g/l in glicerol s končno koncentracijo 20 g/l. Glede na vrsto gojišča smo pred avtoklaviranjem dodali agar s koncentracijo 15 g/l. Gojišče smo prenesli v steklene 500 ml erlenmajerice in jih zaprli z vatnimi zamaški. Nato smo jih sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto pri 121°C 20 minut. Ko se je gojišče po avtoklaviranju ohladilo do 50°C, smo dodali raztopino dušikove baze brez aminokislin (YNB) z dodanim amonijevim sulfatom, antibiotika kloramfenikol (0,05 g/l) in streptomycin (0,03 g/l) ter etanol v končni koncentraciji 20 ml/l. Še toplo gojišče smo narahlo premešali in v brezprašni komori razlili v sterilne plastične petrijeve plošče, pokrili s pokrovi ter pustili, da se gojišče strdi. Do uporabe smo plošče shranili v zaprti plastični vrečki v hladilniku pri 4°C.

Na pripravljene plošče smo s sterilno ezo nacepili različne seve kvasovk iz mikrobiološke zbirke. Plošče z nacepljenimi kulturami smo inkubirali 3-5 dni pri 30°C oziroma do pojava rasti.

3.2.2.2 Priprava tekočega gojišča Sc-ura-GE za gojenje predstopnje rasti v manjših in večjih volumnih

Postopek za pripravo tekočega gojišča Sc-ura-GE je enak kot postopek priprave trdnega gojišča, le da ne vsebuje agarja. V destilirani vodi smo raztopili sintetični kvasni nadomestek brez uracila s končno koncentracijo 1,92 g/l in glicerol s končno koncentracijo 20 g/l. Gojišča smo v primeru gojenja v večjih volumnih (100 ml) prenesli v steklene erlenmajerice z utori, jih zatesnili z vatnimi zamaški in jih sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto. V primeru gojenja kvasovk v manjših volumnih (epruveta 10 ml) smo 9,8 ml

gojišča s pipetmanom prenesli v epruvete, jih narahlo zaprli s plastičnimi pokrovčki in jih avtoklavirali. Po avtoklaviranju ali pred inkubacijo smo v ohlajeno gojišče dodali raztopino dušikove baze brez aminokislin (YNB) z dodanim amonijevim sulfatom, antibiotika kloramfenikol (0,05 g/l) in streptomycin (0,03 g/l) ter etanol v končni koncentraciji 20 ml/l.

3.2.2.3 Priprava tekočega gojišča z maltozo za predstopnjo rasti v večjem volumnu

Tekoče gojišče za predstopnjo rasti v večjem volumnu smo pripravili tako, da smo v destilirani vodi raztopili sintetični kvasni nadomestek brez uracila s končno koncentracijo 1,92 g/l. Gojišče smo prenesli v erlenmajerice in jih zaprli z vatastimi zamaški. Po avtoklaviranju smo v ohlajeno gojišče dodali raztopino dušikove baze brez aminokislin z dodanim amonijevim sulfatom, antibiotika kloramfenikol (0,05 g/l) in streptomycin (0,03 g/l) ter sterilno filtrirano raztopino maltoze s končno koncentracijo 10 g/l.

3.2.2.4 Priprava tekočega gojišča Sc-ura- z dodano glukozo (Sc-ura-Glk) za različne analize

Tekoče gojišče Sc-ura-Glk smo pripravili tako, da smo v destilirani vodi raztopili sintetični kvasni nadomestek brez uracila s končno koncentracijo 1,92 g/l in glukozo s končno koncentracijo 10 g/l. Gojišča smo prenesli v erlenmajerice, jih zaprli z vatastimi zamaški in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo v ohlajena gojišča dodali antibiotika kloramfenikol (0,05 g/l) in streptomycin (0,03 g/l) ter raztopino dušikove baze brez aminokislin z dodanim amonijevim sulfatom. Do uporabe smo gojišča shranili pri sobni temperaturi.

3.2.3 Spremljanje rasti kvasovk na različnih sladkorjih

3.2.3.1 Priprava trdnih gojišč Sc-ura- z dodanimi različnimi sladkorji

Rast transformant *S. cerevisiae* smo spremljali na trdnih gojiščih z različnimi sladkorji. Gojišča smo pripravili po enakem postopku kot trdna gojišča Sc-ura-GE, le da smo namesto glicerola in etanola dodali različne sladkorje. Po avtoklaviranju smo ločeno v gojišča dodali sterilno prefiltrirane raztopine dekstrina, fruktoze, glukoze, maltoze, manoze in saharoze do končne koncentracije 10 g/l. Gojišča smo razlili v plošče in jih pravilno označili. Na pripravljene plošče smo nacepili 5 µl suspenzije s posameznimi transformantami *S. cerevisiae*, ki smo jih predhodno namnožili v gojišču Sc-ura-GE.

Plošče smo oblepili s parafilmskim trakom, da smo preprečili morebitne kontaminacije iz zraka in jih inkubirali 7 dni pri 30°C.

3.2.3.2 Aerobna in anaerobna inkubacija

Rast transformant smo spremljali v aerobnih in anaerobnih pogojih. Aerobne pogoje smo zagotovili z inkubacijo v topli komori pri 30°C (Kambič, Semič), kjer je prisoten kisik. Anaerobne pogoje smo ustvarili tako, da smo v valj dali nacepljene petrijeve plošče, poseben pripravek, ki veže nase kisik in indikator, ki zazna vdor kisika v valj. Valj smo hermetično zaprli in dali v toplo komoro na inkubacijo. V obeh pogojih smo inkubirali 7 dni pri 30°C.

3.2.4 Merjenje hitrosti rasti transformant *S. cerevisiae*

Kolonije celic smo iz plošč Sc-ura-GE prenesli v epruvete z volumnom 10 ml ali erlenmajerice z volumnom 100 ml ter jih inkubirali 4 dni pri 30°C in pri stresanju 160 vrt./min. Gojišče iz epruvet oz. erlenmajeric smo centrifugirali pri 4°C in 3000 vrt./min. Usedlino celic smo sterilno spirali z dodatkom 0,9 % NaCl in Tween 80. Suspenzijo smo ponovno centrifugirali in usedlini celic nato dodali 1 ml gojišča, v katerega smo potem prenesli suspenzijo celic iz epruvet. Gojišča, kjer smo spremljali hitrost rasti, smo predhodno ogreli do 30°C. Nacepljena gojišča smo inkubirali pri 30°C in stresanju 100 vrt./min. Hitrost rasti smo običajno spremljali z vzorčenjem vsako uro različno dolgo. Hitrost rasti kvasnih transformant smo spremljali spektrofotometrično s spektrofotometrom Lambda 25 (Perkin Elmer). Optično gostoto smo določili z merjenjem absorbance suspenzije celic pri valovni dolžini $\lambda = 660$ nm. Za vsako meritev smo iz kulture sterilno odvzeli 1 ml in ga prenesli v kiveto. Kiveto smo pokrili s teflonskim zamaškom. Kiveto smo večkrat obrnili, da smo premešali vsebino.

3.2.5 Merjenje encimske kinetike

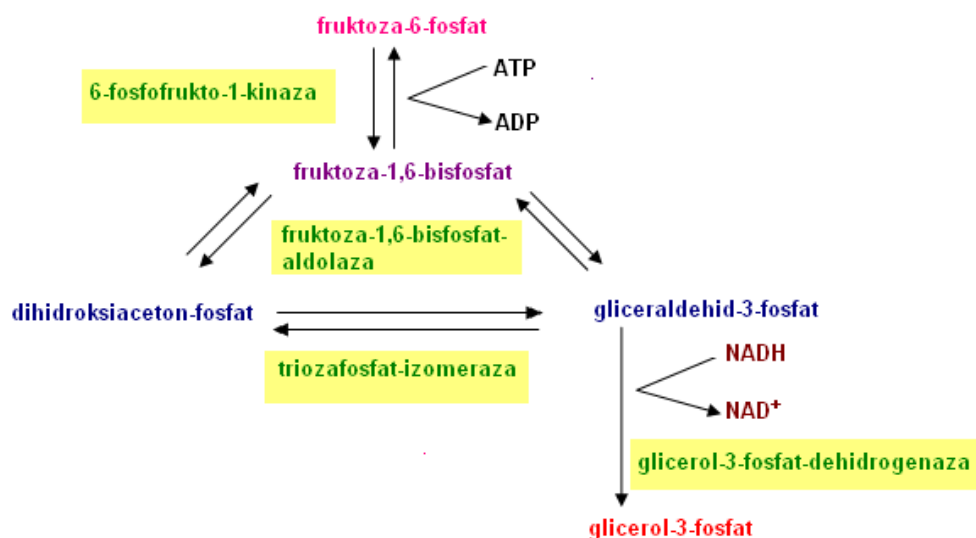
Aktivnost encima PFK1 smo spremljali pri transformantah z zapisom za nativni humani PFK-M in pri transformantah z zapisom za kratki fragment humanega PFK-M.

3.2.5.1 Priprava vzorca

Posamezno kolonijo transformant HD-114-8D z različnima insertoma smo s plošče Sc-ura-GE precepili v epruveto z 10 ml sterilnega tekočega gojišča Sc-ura-GE. Inkubirali smo 4 dni pri 30°C in 160 vrt./min. Po štirih dneh inkubacije, ko je kultura zrasla, smo prenesli 5 ml kulture v dve erlenmajerici s 100 ml gojišča Sc-ura-Glk. Pri obeh smo spremljali naraščanje optične gostote pri 660 nm. Ko je ta dosegla vrednosti med 0,5 in 0,8, smo suspenzijo s celicami najprej ohladili na ledu, da je temperatura padla na manj kot 10 °C. Celice smo nato zbrali s 5-minutnim centrifugiranjem pri 4°C in 3000 vrt./min. Usedlino smo sprali z 10 ml ohlajenega pufra za spiranje (Preglednica 4). Ponovili smo centrifugiranje in usedlino celic zmrznili v tekočem dušiku. Zmrznjene celice smo prenesli v ohlajen teflonski nosilec s kroglico in ga dali v Micro-Dismembrator (Sartorius), kjer smo razbijali celice 20 sekund s 1700 tresljaji/min. Strte celice v obliki prahu smo iz teflonskega nosilca prenesli z ohlajeno spatulo v ohlajeno centrifugirko. Strtim celicam smo dodali 100 µl hladnega ekstrakcijskega pufra (Preglednica 4). Centrifugirko smo prenesli v hladilnik (4°C), da smo dobili pasti podoben skupek proteinov in ostankov celic. Homogenat smo centrifugirali 10 minut pri 4°C in 13200 vrt./min.

3.2.5.2 Merjenje aktivnosti

Aktivnost smo spremljali spektrofotometrično in sicer smo delali v dveh paralelkah. V eni od paralelek smo poleg ostalih reagentov dodali F26bP, ki je močan aktivator vseh treh encimov (Slika 5). V reakcijski mešanici (Preglednica 14) je tekla reakcija pretvorbe fruktoze-6-fosfata do glicerol-3-fosfata po stopnjah prikazanih na sliki 5.



Slika 5: Potek encimske reakcije.

Absorbanco smo merili s spektrofotometrom UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer) pri valovni dolžini 340 nm. NADH pri tej valovni dolžini absorbira svetlobo. Absorbanca se med reakcijo zmanjšuje, ker se NADH pretvarja v NAD⁺. Hitreje kot vrednost absorbance pada, večja je aktivnost encima. Hitrost porabe NADH je bila sorazmerna aktivnosti encima PFK, ker smo v reakcijsko mešanico dodajali reagente in pomožne encime v prebitku. Vrednosti smo podali v encimskih enotah na en ml vzorca (mU/ml). Encimska enota U je enota za količino določenega encima. Definirana je kot količina encima, ki katalizira spremembo 1 μmol substrata v minuti.

Preglednica 14: Reakcijska mešanica za merjenje encimske aktivnosti.

Reagent	Volumen
Pufer za merjenje encimske aktivnosti	500 μl
10 % PEG 6000	440 μl
20 mM NADH	10 μl
100 mM ATP	10 μl
500 mM F6P	5 μl

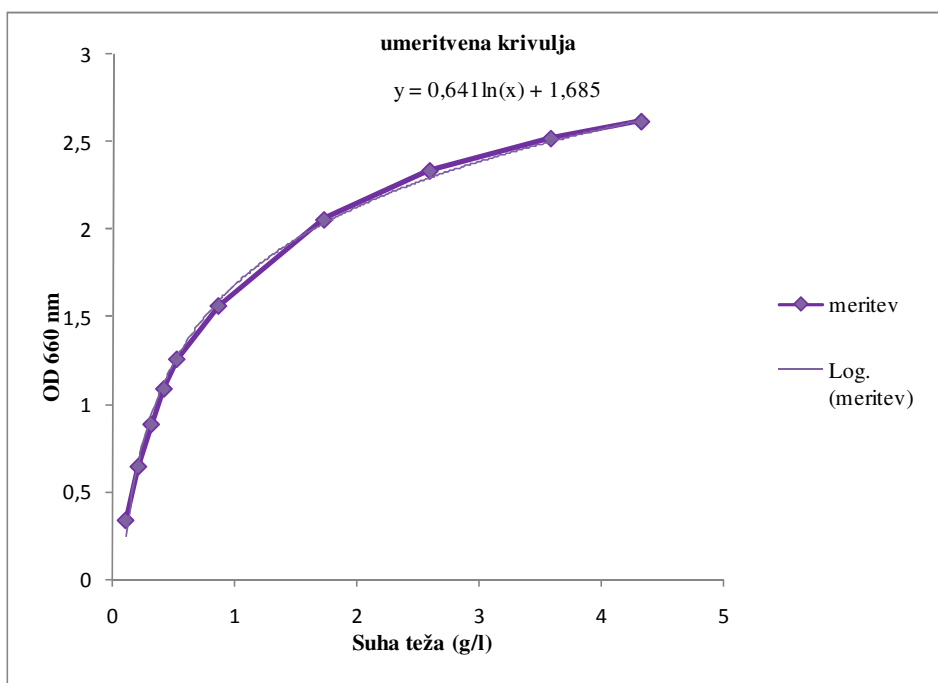
se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 14: Reakcijska mešanica za merjenje encimske aktivnosti.

Reagent	Volumen
Encimi: aldolaza, trioza-fosfat izomeraza, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza	3 μ l
4 μ M F2,6bP	10 μ l
Vzorec	10 μ l
Skupni volumen	1 ml

3.2.6 Merjenje vsebnosti zunajceličnih metabolitov

Vsebnosti zunajceličnih metabolitov smo določali s komercialno dostopnimi kompleti reagentov. Poleg vsebnosti metabolitov smo določili tudi relativno in specifično produktivnost posameznega metabolita. Relativno produktivnost metabolita v eni uri (g metabolita/h) smo določili tako, da smo vsebnost metabolita v dani meritvi odšteli od vsebnosti metabolita v prejšnji meritvi. Specifično produktivnost metabolita (g metabolita/g suhe teže/h) smo določili s pomočjo podatka o relativni produktivnosti in podatka o suhi teži celic, ki smo ga odčitali iz umeritvene krivulje (Slika 6) pri določeni optični gostoti celic v vzorcu. Specifična produktivnost je definirana kot količina metabolita, ki se izloči iz enega grama celic v eni uri.



Slika 6: Umeritvena krivulja pri OD = 660 nm.

3.2.6.1 Določanje koncentracije acetata

Koncentracijo acetata smo določili s pomočjo kompleta reagentov ACETIC ACID (Megazyme).

3.2.6.1.1 Priprava vzorcev

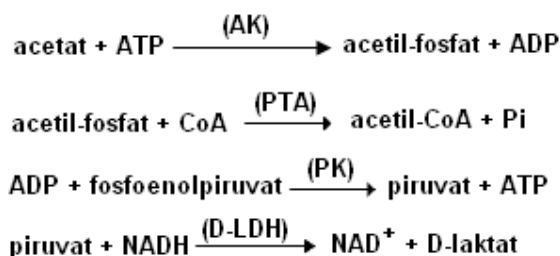
Gojišča, iz katerih smo vzeli vzorce za meritve koncentracij acetata, so bila Sc-ura-glc z različnimi koncentracijami glukoze. Volumen gojišča je bil 100 ml. Delali smo v eni paralelki za vsako koncentracijo sladkorja v gojišču (1 %, 2,5 %, 5 % in 10 % glukoze) in spremljali izločanje acetata pri transformantah z zapisom za nhPFK-M in za kratki fragment hPFK-M. Izločanje acetata smo spremljali po prenosu v gojišče Sc-ura-Glc na vsako uro do 5. ure ter nato vmes še v različno dolgih intervalih do 24. ure.

Vzorec smo sterilno vzeli iz gojišča. Pazili smo, da smo erlenmajerico z gojiščem takoj po odvzemu vzorca vrnili na stresalnik, zato da se gojišče ni preveč ohladilo in bi s tem povzročili dodaten stres za kvasovke. En ml gojišča smo prenesli v označeno centrifugirko

in vsebino hladno centrifugirali 3 minute pri 4°C in 3000 vrt./min. Nato smo 0,5 ml supernatanta prenesli v novo označeno centrifugirko in jo do uporabe shranili pri -20°C. Pred uporabo smo jih prenesli v hladilnik (4°C), da so se počasi odtalili. Pred in med meritvami smo vzorce inkubirali na ledu.

3.2.6.1.2 Merjenje koncentracij acetata

Po navodilih proizvajalca (Megazyme) smo izvedli meritve. Količina NAD^+ , ki se je tvorila v reakciji, je stehiometrična količini acetata v vzorcu. Acetat kinaza (AK) v prisotnosti ATP pretvori acetat v acetil-fosfat in adenzin-5'-difosfat (ADP). Reakciji sledi hitra pretvorba acetil-fosfata v acetil-CoA, ki jo posreduje fosfotransacetilaza (PTA). ADP iz prve reakcije se pretvori v ATP in piruvat ob prisotnosti piruvat kinaze (PK). D-laktat dehidrogenaza (D-LDH) reducira piruvat do D-laktata ob sočasni tvorbi NAD^+ (Slika 7).



Slika 7: Potek reakcije porabe acetata in tvorbe NAD^+ .

Spremembo v zmanjšanju absorbanca v vzorcih zaradi nastalega NAD^+ smo spremljali s spektrofotometrom (Perkin Elmer) pri valovni dolžini 340 nm. Koncentracijo acetata smo izračunali s pomočjo stehiometrične enačbe (1),

$$c = 0,2535 \times \Delta A_{\text{acetat}} \times F \quad \dots(1),$$

kjer je c simbol za koncentracijo, Δ za spremembo v absorbanci, F pa faktor redčenja.

3.2.6.2 Določanje koncentracije etanola

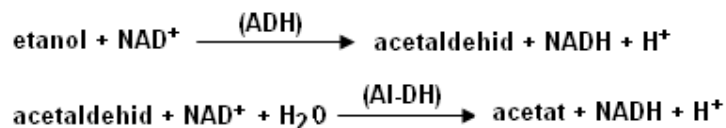
Koncentracijo etanola smo določili s pomočjo kompleta reagentov ETHANOL (Megazyme).

3.2.6.2.1 Priprava vzorcev

Vzorci smo za meritve koncentracije etanola pripravili po enakem postopku kot za merjenje koncentracije acetata.

3.2.6.2.2 Merjenje koncentracije etanola

Meritve smo izvedli po navodilih proizvajalca (Megazyme). Količina NADH, ki se nastane v reakciji, je stehiometrično enaka dvakratni količini etanola v vzorcu. Pri ugotavljanju količine etanola v vzorcu tečeta dve encimski reakciji. Prvo reakcijo katalizira alkoholna dehidrogenaza (ADH), ki pretvori etanol ob prisotnosti NAD^+ v acetaldehid. Ravnotežje reakcije je pomaknjeno na stran etanola, zato je potrebna druga reakcija. V drugi reakciji teče oksidacija acetaldehida do acetata v prisotnosti encima aldehid dehidrogenaze (ALDH) in NAD^+ . V tej reakciji nastaja NADH, ki ga zaznamo s spektrofotometrom (Perkin Elmer) kot porast absorbance pri valovni dolžini 340 nm (Slika 8).



Slika 8: Potek encimske reakcije pretvorbe etanola in nastanka NADH.

S pomočjo enačbe (2) navedene v navodilih za uporabo kompleta reagentov, smo ob upoštevanju faktorja redčenja (F) izračunali koncentracijo etanola (c) v vzorcu.

$$c = 0,09287 \times \Delta A_{\text{etanol}} \times F \quad \dots(2)$$

3.2.6.3 Določanje koncentracije glicerola

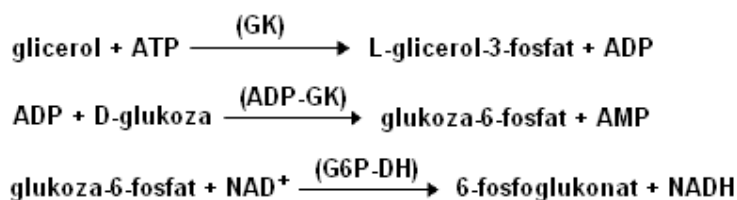
Koncentracijo glicerola smo določili s pomočjo kompleta reagentov GLYCEROL GK (Megazyme).

3.2.6.3.1 Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili po enakem postopku kot za merjenje koncentracije acetata.

3.2.6.3.2 Merjenje koncentracije glicerola

Meritve smo izvedli po navodilih proizvajalca kompleta reagentov (Megazyme). Koncentracija NADH, ki nastane po končani reakciji, je stehiometrično enaka količini glicerola v vzorcu. Glicerol kinaza (GK) ob prisotnosti ATP fosforilira glicerol do L-glicerol-3-fosfata, pri čemer nastane tudi ADP. ADP s pomočjo encima ADP-glukokinaze (ADP-GK) posreduje fosfat D-glukozi v naslednji reakciji, kjer nastane glukoza-6-fosfat in AMP. Ob prisotnosti encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6P-DH) poteče oksidacija glukoze-6-fosfat z NAD^+ do 6-fosfoglukonata. V tej zadnji stopnji se tvori NADH (Slika 9).



Slika 9: Potek encimske reakcije pretvorbe glicerola in nastanek NADH.

Spremembo v absorbanci zaradi tvorbe NADH smo merili s spektrofotometrom pri valovni dolžini 340 nm. S pomočjo enačbe (3) smo izračunali koncentracijo glicerola (c) v vzorcu.

$$c = 0,2982 \times \Delta A_{\text{glicerol}} \times F \quad \dots(3)$$

3.2.7 Določanje viabilnosti kvasnih celic

Preživetje kvasnih celic *S. cerevisiae* v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % smo spremljali na dva različna načina. Pri obeh metodah nas je zanimala stopnja odmiranja in spremenjene strukture v primeru celic, ki so odmrle.

3.2.7.1 Določanje viabilnosti z barvanjem z metilenskim modrilom

Viabilnost smo določali s preprosto metodo barvanja z metilenskim modrilom. Metilensko modrilo vstopa v celice. Mrtve celice niso sposobne prečrpavanja barvila v zunanost in tako se pojavi modra obarvanost celice. To je zadosten znak za odmrlo celico. Žive celice prečrpajo barvilo v svojo zunanost in zato niso obarvane. S to metodo smo izvedeli le, ali

so celice odmrle ali pa preživele v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %, ne pa tudi ali gre pri odmiranju za proces apoptoze ali nekroze, saj tega metoda ne omogoča. Poleg same viabilnosti smo spremljali tudi morfologijo celic in brstenje.

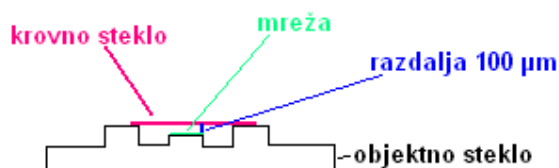
3.2.7.1.1 Priprava vzorcev

Celice smo najprej sterilno z zobotrebcem precepili iz plošč Sc-ura-GE v epruvete Sc-ura-GE. Epruvete smo inkubirali 4 dni pri 30°C in stresanju s 160 vrt./min. Suspenzijo celic iz epruvet smo po inkubaciji centrifugirali 3 minute pri 3000 vrt./min in 4°C. Nato smo dodali usedlini celic 1 ml gojišča Sc-ura-Glk 2,5 %, pazljivo premešali vsebino in prenesli 1 ml suspenzije v gojišče Sc-ura-Glk 2,5 %. Erlenmajerice z gojiščem in vcepkom smo inkubirali pri 30°C s stresanjem 100 vrt./min. Vzorce smo jemali tako, da smo sterilno prenesli 1 ml gojišča Sc-ura-Glk 2,5 % s celicami v centrifugirko, mu dodali 100 µl barvila metilen modro in inkubirali pol ure.

3.2.7.1.2 Določanje preživetja celic z barvilom metilen modro

Po inkubaciji smo vzeli približno 10 µl suspenzije, kapnili na objektno stekelce (Thoma Fein-Optik) z mrežo za štetje celic in dvema vdolbinama (Slika 10). Na stekelce smo položili še krovno stekelce in odvečna suspenzija je stekla v vdolbini. Celice smo opazovali s svetlobnim mikroskopom (Wild) pod 400-kratno povečavo. V naključno izbranih 10 kvadrantih smo prešteli število odmrlih in živih celic ter opazovali morfologijo celic. Izračunali smo povprečje celic. Število celic v 1 ml smo izračunali s pomočjo enačbe (4), kjer je x povprečno število celic/ml, a pa je povprečno število celic v 10 kvadrantih.

$$x = a \times 4 \times 10^6 / ml \quad \dots(4)$$



Slika 10: Prečni prerez objektnega stekla Thoma; Fein-Optik Jena.

3.2.7.2 Določanje viabilnosti s kompletom reagentov

Viabilnost smo določali tudi s kompletom reagentov (Molecular Probes) za določanje viabilnosti kvasnih celic. Celice smo opazovali pod konfokalnim mikroskopom (Leica).

3.2.7.2.1 Priprava vzorcev

Najprej smo pripravili predstopnje rasti v erlenmajericah z volumnom 100 ml. Gojišče v predstopnji rasti je bilo Sc-ura-malt 1 %. Kulturo v erlenmajericah smo inkubirali 4 dni pri 4°C in stresanju 100 vrt./min. Celice smo prenesli po že opisanem postopku v 50 ml gojišča Sc-ura-Glk 2,5 % ter inkubirali pri 30°C in stresanju s 100 vrt./min. Spremljali smo preživetje celic po 2, 3 in 4 urah ter pri skuhanih (mrtvih) celicah. Za kontrolo smo pripravili suspenzijo s popolnoma živimi celicami, ki smo jih vzeli iz predstopnje rasti v erlenmajericah, in popolnoma mrtvimi celicami, ki smo jih pripravili s kratko inkubacijo v vroči kopeli 100 °C. Za določanje viabilnosti smo uporabili komplet reagentov (Molecular Probes). Pred samim opazovanjem pod mikroskopom smo pripravili vse potrebne reagente. Najprej smo pripravili raztopino, kjer smo 10 ml 10 mM pufru HEPES pH 7,2 dodali 2,5 % Glk (raztopina GH) in sterilno filtrirali. Nato smo uporabili 2 ml raztopine GH in ji dodali 10 µl 10 mM raztopine barvila FUN1 v DMSO ter tako dobili 50 µM raztopino barvila FUN1. Barvilo smo shranili v centrifugirko in jo ovili z alufolijo, zato da je barvilo ostalo na temnem in ne razpada. Iz gojišča Sc-ura-Glk 2,5 % smo sterilno vzeli 200 µl suspenzije s celicami in jo centrifugirali 3 minute pri 3000 vrt./min. Po centrifugiranju smo usedlini celic dodali 1 ml raztopine GH. Vzorec za opazovanje s konfokalnim mikroskopom smo pripravili tako, da smo 100 µl celic, resuspendiranih v raztopini GH, dodali 100 µl 50 µM raztopine FUN1. Vzorec smo previdno premešali in nato inkubirali 30 minut pri 30°C v temi. Po inkubaciji smo vzorec opazovali pod konfokalnim mikroskopom.

3.2.7.2.2 Razločevanje živih celic od mrtvih s konfokalnim mikroskopom

Pri opazovanju s konfokalnim mikroskopom smo najprej nastavili filtre po navodilih proizvajalca kompleta reagentov. Nastavili smo fluoresceinski filter na ekscitacijo 480 nm in emisijo ≥ 530 nm. Posneli smo fotografije in jih shranili.

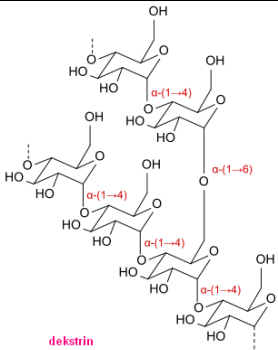
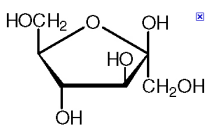
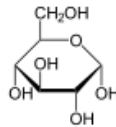
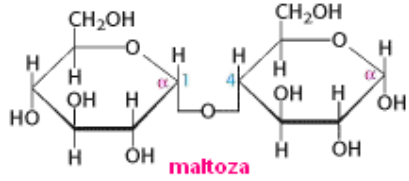
Vsi poskusi so bili večkrat ponovljeni, prikazani pa so le najbolj reprezentativni rezultati.

4 REZULTATI

4.1 RAST TRANSFORMANT NA RAZLIČNIH SLADKORJIH

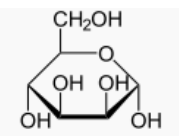
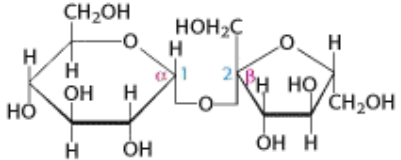
Rast smo spremljali pri vseh transformantah (oznaka 5-8) na različnih tipih sladkorjev (Preglednica 15), da bi ugotovili, na katerem sladkorju je rast najboljša, oziroma kje se geni za uporabo glukoze vklopijo. Sprva nas je zanimalo, na katerem sladkorju bo rast transformant v aerobnih pogojih najboljša (Slika 11). Nato smo preverili, ali se rast transformant razlikuje glede na anaerobno (Slika 12) in aerobno okolje na gojišču z maltozo, kjer je bila rast v aerobnih pogojih najboljša (Slika 11).

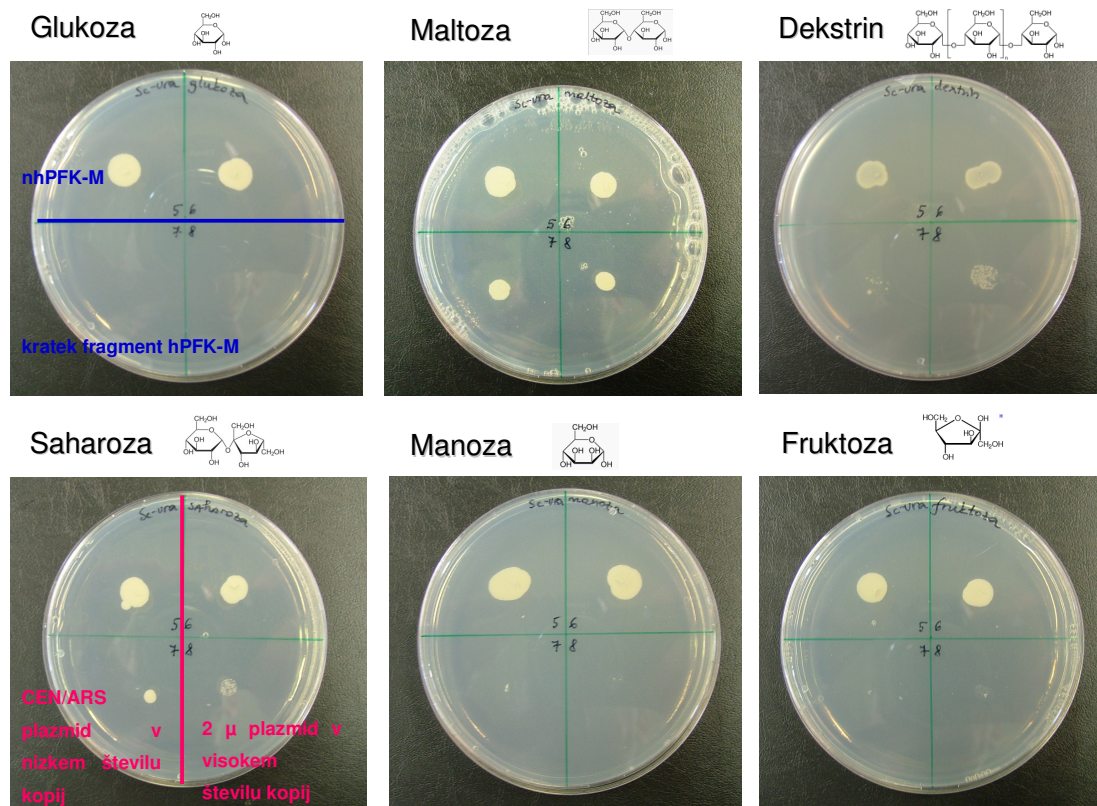
Preglednica 15: Tipi sladkorjev (prirejeno po Berg in sod., 2002).

Sladkor	Tip	Sestava	Formula
dekstrin	sestavljen sladkor, polisaharid	polimer D-glukoze, povezane z α -1,4- ali α -1,6-glikozidnimi vezmi	
fruktoza	enostaven sladkor, monosaharid	fruktoza	fruktoza 
glukoza	enostaven sladkor, monosaharid	glukoza	glukoza 
maltoza	sestavljen sladkor, disaharid	2 glukoza ostanka, povezana z α -1,4-glikozidno vezjo	

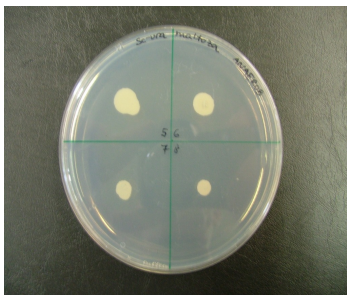
se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 15: Tipi sladkorjev (prirejeno po Berg in sod., 2002).

Sladkor	Tip	Sestava	Formula
manzoa	enostaven sladkor, monosaharid	manzoa	manzoa 
saharoza	sestavljen sladkor, disaharid	fruktoza in glukoza povezani z O- glikozidno vezjo	 saharoza



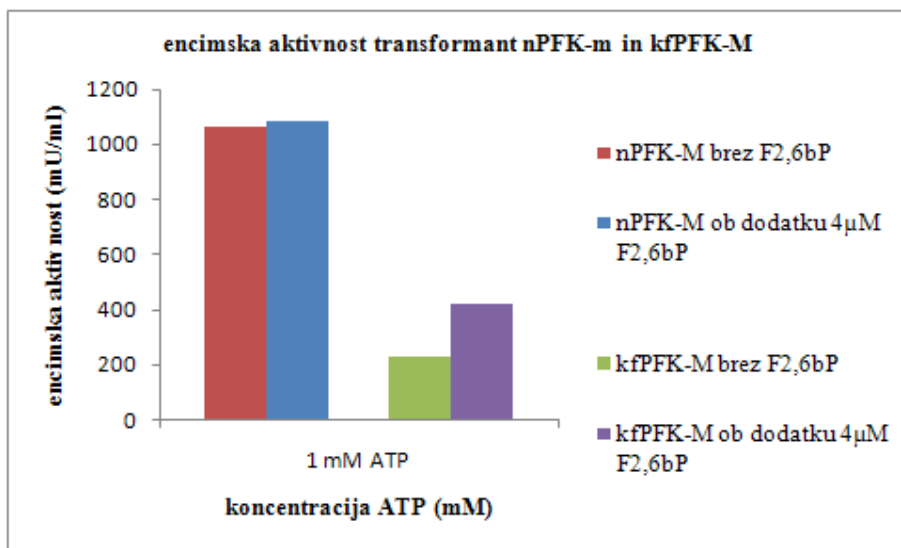
Slika 11: Rast transformant na različnih sladkorjih v aerobnih pogojih.



Slika 12: Rast transformant na gojišču z maltozo, ki smo ga gojili v anaerobnih pogojih.

Na sliki 11 je prikazan razvoj kolonij transformant po 7-dnevni rasti na različnih sladkorjih. Na vzdolžno predeljenih ploščah so na zgornji polovici transformante z nativnimi humanimi PFK (nPFK-M), na spodnji polovici pa transformante s kratkimi fragmenti humanega PFK (kfPFK-M). Prečna predelitev plošč loči transformante s plazmidom CEN/ARS, ki nastopa v celicah v majhnem številu kopij-na levi strani in 2 μ plazmidom, ki nastopa v celicah v velikem številu kopij-na desni strani plošče. Na ploščah z dodano glukozo, manozo in fruktozo so rasle transformante z nativnim humanim fragmentom, medtem ko transformante s kratkim fragmentom niso rasle. Na dekstrinu smo opazili slabo rast vseh transformant, medtem ko je bila rast vseh transformant najboljša na gojišču z dodano maltozo. Na saharozi je bila v primerjavi z dobro rastjo transformant z nhPFK rast transformant s kratkim fragmentom hPFK slabša. Ker je bila rast najboljša na maltozi, nas je zanimalo, ali je kakšna razlika med rastjo transformant v aerobnih in anaerobnih pogojih na gojišču z maltozo. Tako v aerobnih kot anaerobnih pogojih so rasle vse transformante enako dobro in se rast zaradi različne inkubacije ni razlikovala.

4.2 ENCIMSKA AKTIVNOST



Slika 13: Encimska aktivnost nPFK-M in kfPFK-M.

Pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M nas je zanimala aktivnost encima PFK1, ki smo jo preverili s testom encimske aktivnosti (Slika 13). Encimsko aktivnost smo podali v enotah mU/ml. Encimska enota U je enota za količino določenega encima. Definirana je kot količina encima, ki katalizira spremembo 1 μmol substrata v minuti. Encimsko aktivnost smo odčitali 2 minuti po začetku reakcije. Pri transformanti nPFK-M smo ugotovili, da se encimska aktivnost tudi po dodatku 4 μM aktivatorja F2,6bP ni bistveno spremenila. Meritve smo opravljali v območju maksimalne aktivnosti, zato je bila pri kratkem fragmentu večja razlika med meritvijo z in brez dodanega aktivatorja F2,6bP kot pri meritvah z nativnim proteinom. Encimska aktivnost je bila večja pri transformanti nPFK-M, ki vsebuje nativni humani encim PFK1, medtem ko je bila aktivnost pri transformanti kfPFK-M s kratkim fragmentom bistveno manjša.

4.3 IZBIRA GOJIŠČA ZA PRIPRAVO BIOMASE PRED TESTOM RASTI V GLUKOZNEM GOJIŠČU

Za pripravo dovolj velikega števila celic pred prenosom v gojišče z glukozo, kot edinim virom ogljika, smo testirali dve različni gojišči. Prvo gojišče je kot vir ogljika vsebovalo

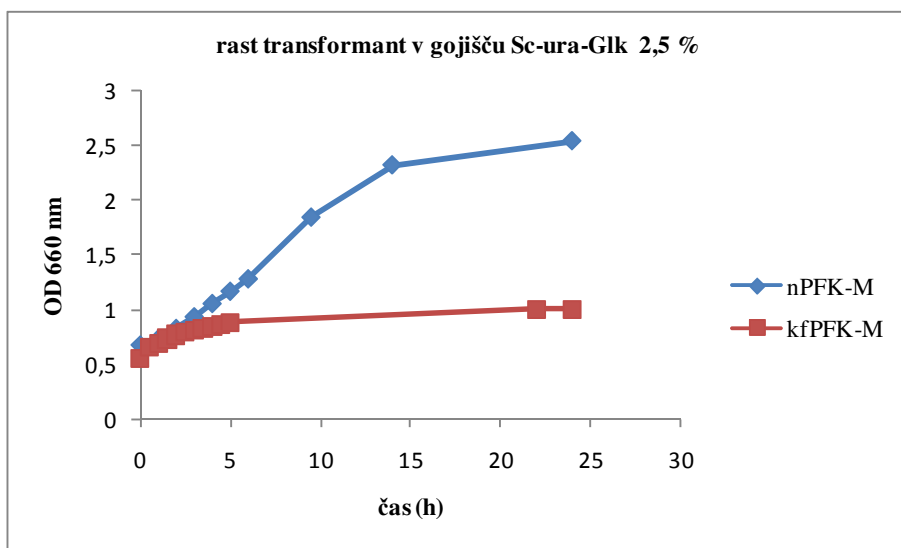
glicerol in etanol kot tipično nefermentativna vira ogljikovih hidratov, drugo pa maltozo, disaharid glukoze, ki je omogočala rast vseh transformant.

4.3.1 Predstopnja rasti v gojišču z glicerolom in etanolom (Sc-ura-GE) in spremljanje preživetja celic

Za predstopnjo rasti smo izbrali gojišče Sc-ura-GE v volumnu 100 ml. Predvidevali smo, da bodo transformante uspešno rastle v predstopnji rasti in se bo takšna rast nadaljevala tudi ob prenosu v gojišče Sc-ura- Glk 2,5 %.

4.3.1.1 Rast transformant v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-GE

Do vrednosti $OD_{660nm} = 0,6$ smo transformante gojili v selektivnem gojišču Sc-ura-GE, ki je omogočalo rast le transformantam s plazmidom. Po prenosu transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišče Sc-ura-Glk 2,5 % smo z merjenjem optične gostote (OD) zaznali različno rast pri transformantah (Slika 14). Pri nPFK-M je rast naraščala celoten čas meritve, pri kfPFK-M pa je rast naraščala do približno 5 ur po prenosu v glukozno gojišče, nato pa je rast pojemala in se ustavila. Zaradi takšnega rezultata nas je zanimalo, kako je s preživelostjo celic v gojišču Sc-ura- Glk 2,5 %.



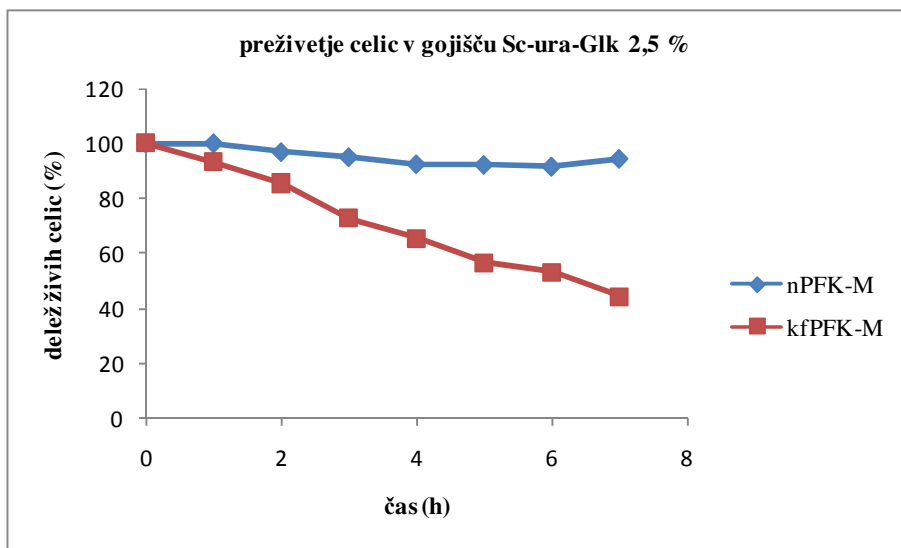
Slika 14: Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M po prenosu iz gojišča Sc-ura-GE v gojišče Sc-ura-Glk 2,5 %.

4.3.1.2 Preživetje celic v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-GE

Preživetje smo spremljali s prenosom celic iz predstopnje rasti Sc-ura-GE v gojišče Sc-ura-Glk 2,5 %. Preživetje celic smo preverili na dva načina; z barvilom metilensko modrilo pod svetlobnim mikroskopom in kompletom reagentom FUN1 pod konfokalnim mikroskopom.

4.3.1.2.1 Barvanje celic z metilenskim modrilom

Glede na to, da je bila rast transformante nPFK-M boljša od zavrte rasti transformante kfPFK-M, smo se odločili, da bomo na enostaven način preverili, kolikšen je delež živih celic v gojišču z 2,5 % glukoze s predstopnjo rasti v Sc-ura-GE v posameznih časovnih presledkih pri obeh transformantah.



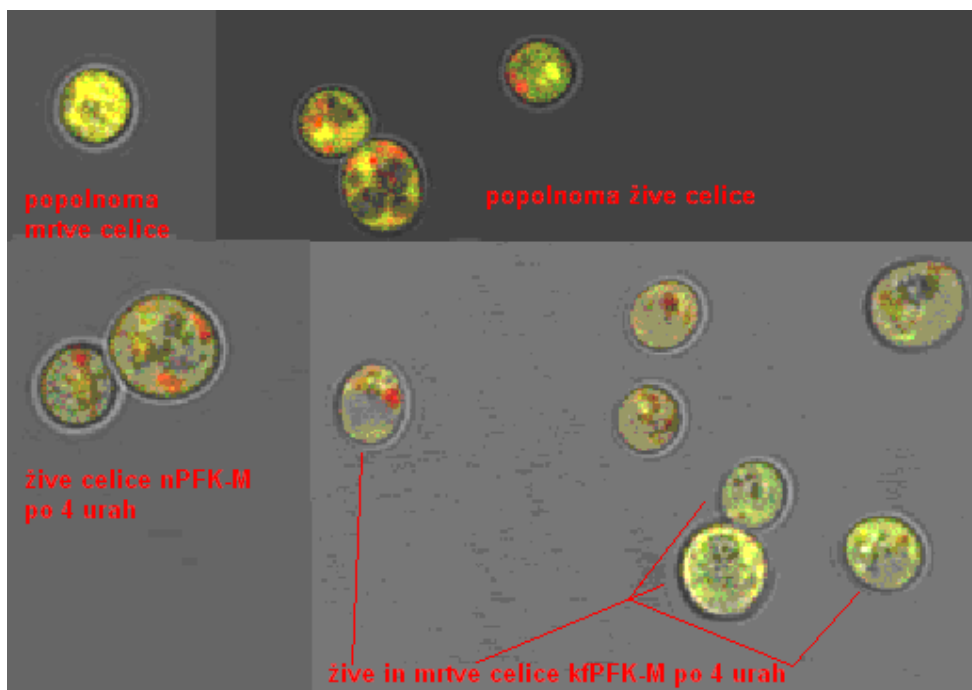
Slika 15: Preživetje celic transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %. Prikazani sta krivulji za delež živih celic transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v Sc-ura-GE.

Iz slike 15 lahko razberemo, da se delež živih celic pri transformanti nPFK-M ni bistveno spreminjal in ni upadal. Pri opazovanju s svetlobnim mikroskopom smo opazili tudi, da so celice tvorile manjše in večje brste. Mrtvih celic je bilo zelo malo, med njimi so bile večinoma starejše celice. Pri transformanti kfPFK-M se je odmiranje celic začelo že na začetku in se je delež živih celic hitro manjšal. Približno enak delež živih in mrtvih celic

smo zasledili po 6. uri opazovanja. Odmrli so najprej predvsem mladi brsti, kasneje pa tudi starševske celice z brsti. Brstečih celic je bilo na splošno manj v primerjavi s transformanto nPFK-M.

4.3.1.3 Barvanje celic s kompletom reagentov FUN1

Poizkusili smo metodo barvanja celic z barvilom FUN1, saj smo želeli podkrepiti metodo barvanja z metilenskim modrilom. Pričakovali smo, da bo metoda ob uporabi konfokalnega mikroskopa primerna, vendar se ni izkazala za takšno. Nismo namreč mogli zagotoviti povsem enakih časov inkubacije. Metoda pa bi bila primerna za uporabo v pretočnem citometru. Kljub temu smo posneli fotografije popolnoma živih in mrtvih celic (Slika 16). Za kontrolo smo vzeli mrtve celice (termično obdelane) in kulturo živih celic. Kontrola nam je služila za lažjo obdelavo vzorcev, kjer sta nas zanimali obe vrsti celic. Mrtve celice so imele celotno celično vsebino obarvano zeleno-rumeno, medtem ko so imele žive celice v vakuolah rdečo obarvane cilindrične strukture.



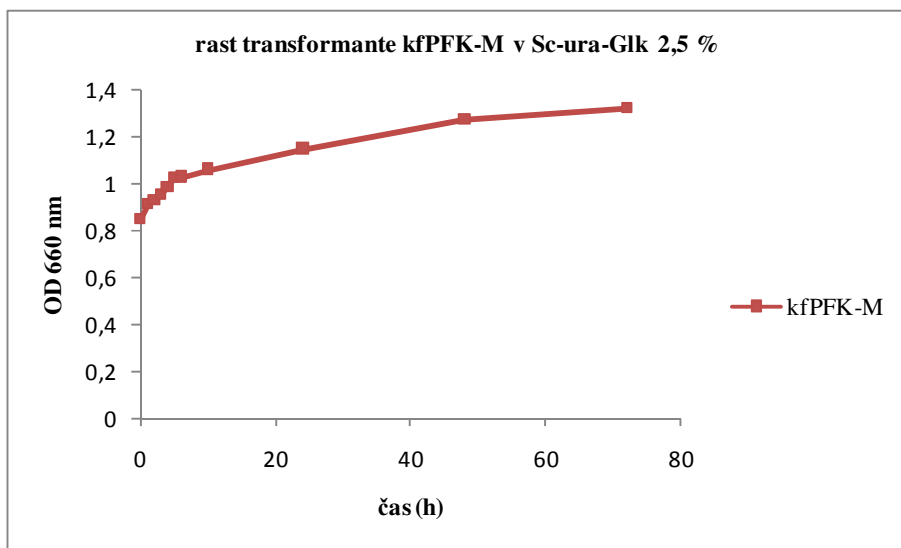
Slika 16: Mrtve in žive celice, celice transformant nPFK-M in kfPFK-M po 4 urah opazovanja.

4.3.2 Predstopnja rasti v gojišču z 1 % maltozo (Sc-ura-malt 1 %) in spremljanje preživetja celic

Zaradi slabe rasti predvsem transformante kfPFK-M nas je zanimalo, kakšna je rast in preživetje le-te po prenosu, če imamo v predstopnji rasti gojišče Sc-ura-malt 1 %. Predvidevali smo, da bo rast boljša, ker so se celice prilagodile na glukozo že v predstopnji rasti in so po vsej verjetnosti bili vsi glikolitični encimi ob prenosu v glukozno gojišče že sintetizirani.

4.3.2.1 Rast transformante kfPFK-M s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-malt 1 %

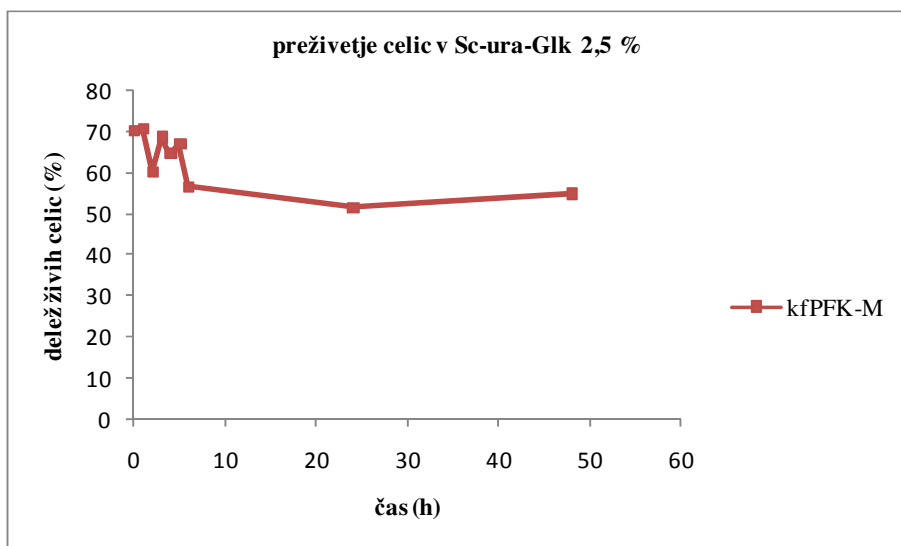
Celice za predstopnjo rasti smo nacepili v 100 ml gojišča Sc-ur-malt 1 %. Z dodatkom maltoze v gojišče smo zagotovili počasno sproščanje glukoze v gojišče. Celice so se v predstopnji rasti prilagodile na glukozo. Na sliki 17 je prikazana rast transformante kfPFK-M pri prenosu v gojišče Sc-ura-Glk 2,5 %. Opazili smo dve stopnji rasti. Hitrost rasti je do 6. ure strmo naraščala, nato pa se je postopoma zmanjševala. Nadalje nas je zanimala preživetje transformante kfPFK-M ob prenosu v gojišče Sc-ura- Glk 2,5 %.



Slika 17: Rast transformante kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.

4.3.2.2 Preživetje celic v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-malt 1%

Glede na dobro rast transformante kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % nas je zanimalo, kakšno je preživetje celic v tem gojišču. Preživetje smo ocenili z metodo barvanja z barvilom metilensko modrilo. Slika 18 prikazuje delež živih celic transformante kfPFK-M. Med hitro rastjo, ki smo jo opazili do 6. ure, smo opazili hitro odmiranje celic. Nato se je hitrost odmiranja umirila oziroma je bila hitrost odmiranja približno enaka hitrosti nastajanja novih celic.



Slika 18: Preživetje celic transformante kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % s predstopnjo rasti v gojišču Sc-ura-malt 1 %. Prikazana je krivulja z deležem živih celic v 1 ml gojišča.

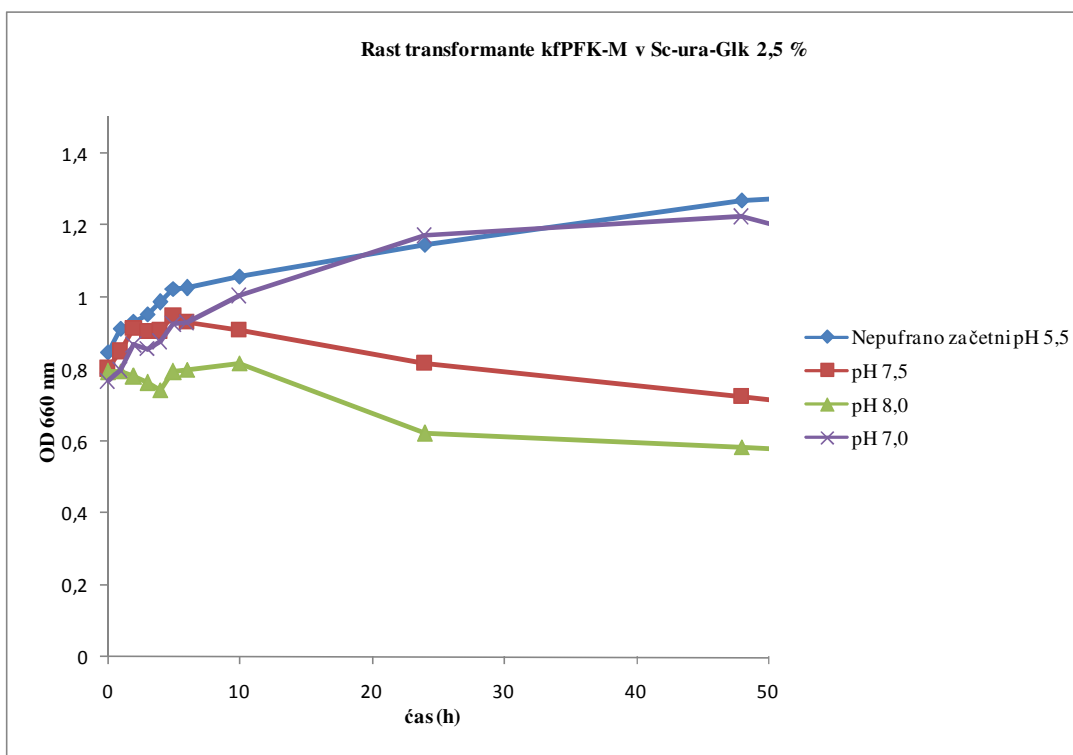
4.4 PRIMERJAVA MED RASTJO CELIC IN VSEBNOSTJO ZUNAJCELIČNIH METABOLITOV V GOJIŠČIH Z URAVNANO IN NEURAVNANO VREDNOSTJO pH PRI TRANSFORMANTI kfPFK-M

V predstopnji rasti smo gojili celice v gojišču Sc-ura-malt 1 %. Nato smo jih po spiranju z 0,9 % NaCl in Tween 80 ter centrifugiranju prenesli v gojišča z dodanimi različnimi koncentracijami glukoze in spremljali rast. Vrednost pH smo uravnali s 100 mM pufrom HEPES z različnimi vrednostmi pH (od pH 7,2 do pH 8,0) tako, da je bila končna vrednost

pH po dodatku YNB + amonsulfat v gojišču 7,0, 7,5 ali 8,0. Pri transformanti kfPFK-M smo primerjali rast celic in vsebnost zunajceličnih metabolitov v gojiščih z uravnano in neuravnano vrednostjo pH. Najprej smo navedene parametre spremljali na nezapufranih gojiščih, nato nas je zanimalo, ali je kakšna razlika pri gojenju v zapufranih gojiščih.

4.4.1 Rast v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %, kjer je vrednost pH uravnana in neuravnana

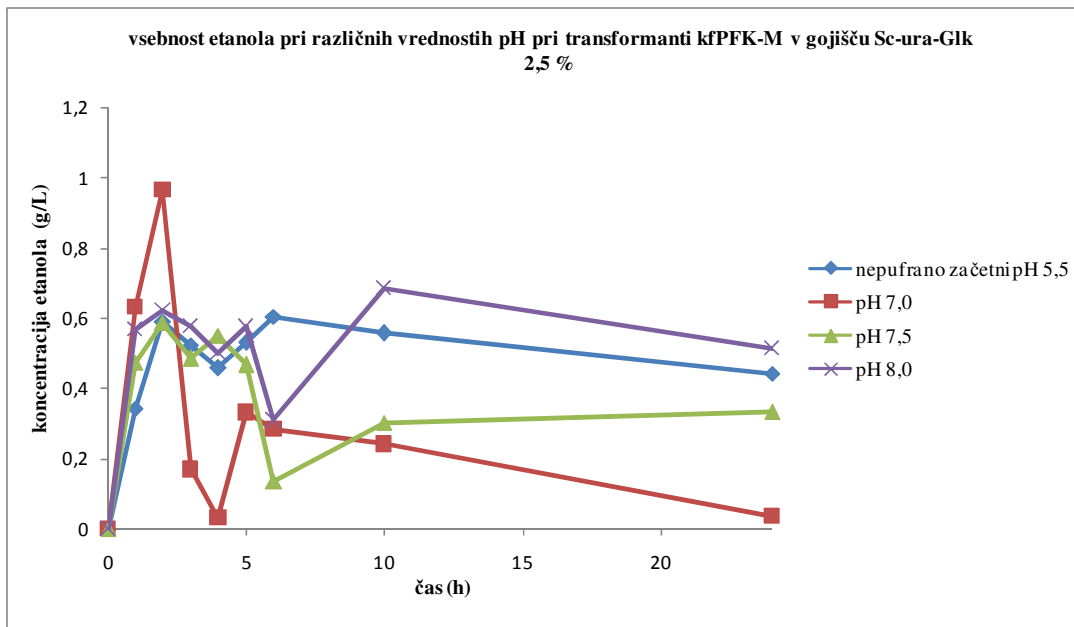
Rast smo pri transformanti kfPFK-M zaznali v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % z neuravnano vrednostjo pH in z uravnano vrednostjo pH (pH 7,0) (Slika 19). Na začetku je rast strmo naraščala do 5. ure, nato pa se je upočasnila, a še vedno naraščala. Rast je bila na začetku prisotna tudi v gojišču z vrednostjo pH 7,5 in 8,0, vendar je kmalu upadla in se je ustavila. Končna vrednost pH v nezapufranem gojišču ob koncu gojenja je bila 4,2.



Slika 19: Rast transformante kfPFK-M v nezapufranem in zapufranih gojiščih Sc-ura-Glk 2,5 %.

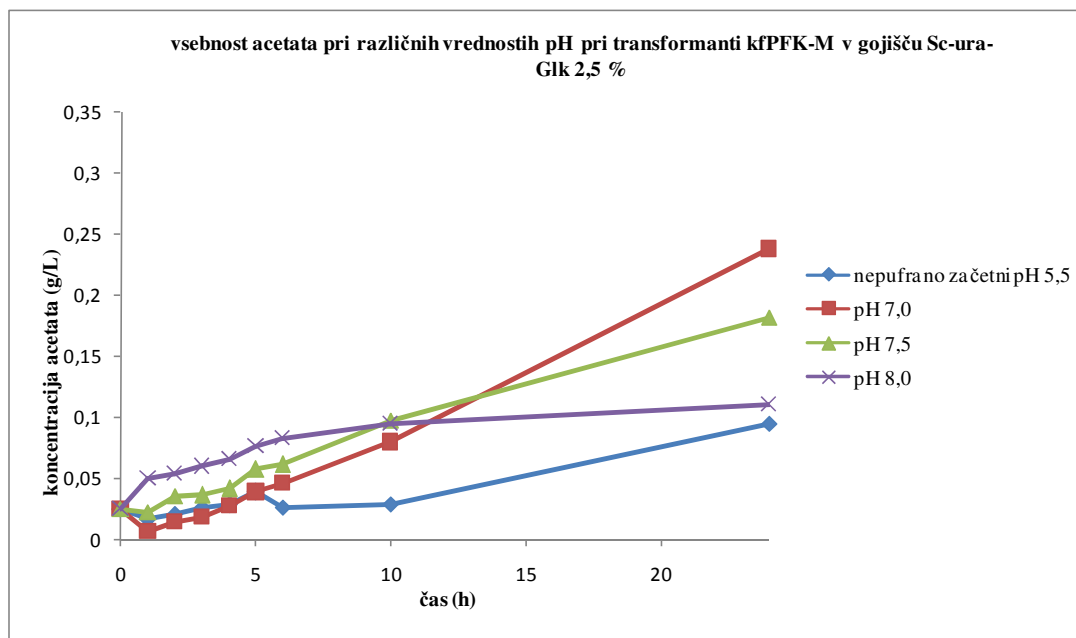
4.4.2 Vsebnost zunajceličnih metabolitov v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % z uravnano in neuravnano vrednostjo pH pri transformanti kfPFK-M

Istočasno s spremljanjem rasti transformante kfPFK-M v gojiščih z različnimi vrednostmi pH smo spremljali vsebnosti zunajceličnih metabolitov (Slika 20 in 21).



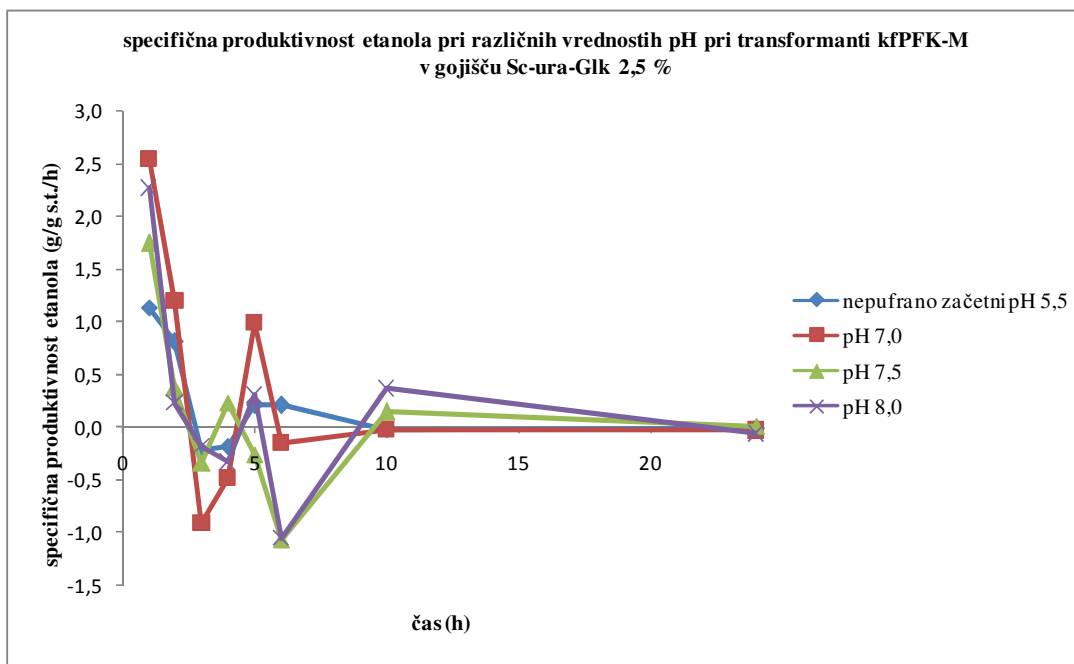
Slika 20: Vsebnost etanola v gojišču pri transformanti kfPFK-M, ki smo jo gojili v nezapufranem in zapufranem gojiščih Sc-ura-Glk 2,5 %.

Etanol se je do 2. ure izločil v največji koncentraciji pri gojenju v gojišču z vrednostjo pH 7,0 in tu smo zaznali visoke koncentracije etanola v vzorcu (Slika 20). Nato je količina etanola strmo upadla najverjetneje zaradi presnove etanola s strani celic. V začetnih urah gojenja smo tudi pri ostalih tipih gojišč opazili hiter porast koncentracije etanola, vendar je bil ta v primerjavi s koncentracijo pri pH 7,0 precej manjši. Tekom nadaljnjega gojenja se je v gojišču s pH vrednostjo 7,5 nivo etanola zmanjšal, medtem ko je pri nezapufranem gojišču in gojišču s pH vrednostjo 8,0 ostal na nivoju iz začetnih ur.



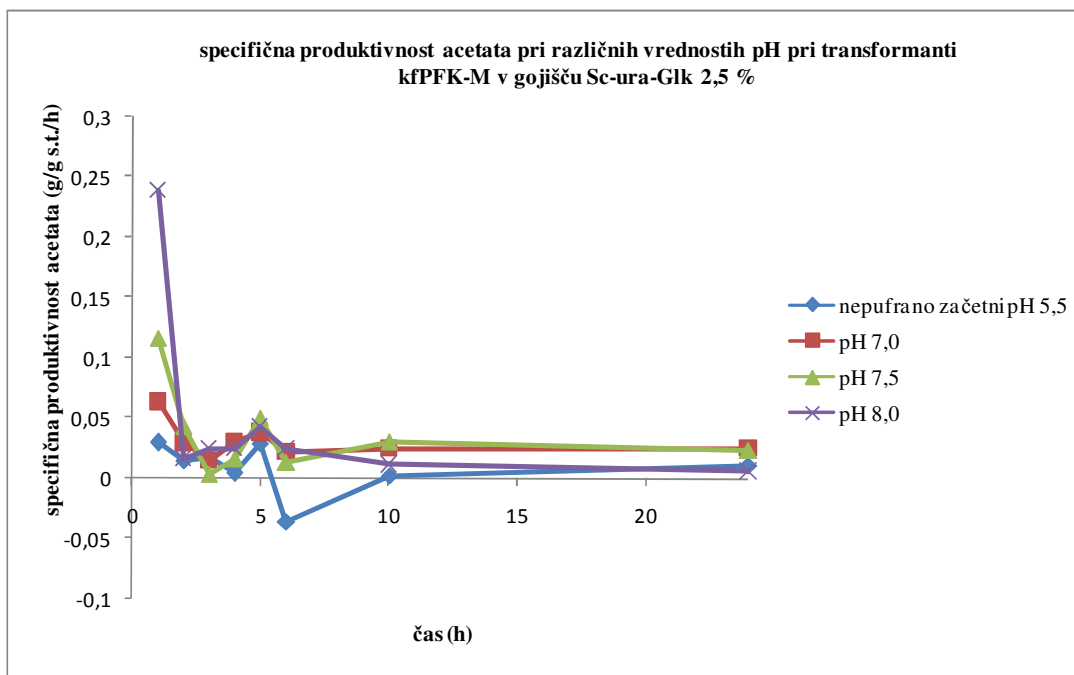
Slika 21: Vsebnost acetata v gojišču pri transformanti kfPFK-M, ki smo jo gojili v nezapufranem in zapufranem gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.

Acetat je bil pri gojenju transformante kfPFK-M prisoten v vseh tipih gojišč (Slika 21). Acetat se je postopoma izločal v gojišče in njegova koncentracija tekom gojenja ni upadala ampak rasla. Na začetku je bil najhitrejši porast koncentracije acetata v gojišču z vrednostjo pH 8,0. Ob koncu gojenja, po 24 urah, smo največjo koncentracijo acetata izmerili v gojišču z uravnano vrednostjo pH 7,0, kjer je bil porast koncentracije največji glede na začetno koncentracijo acetata. Nekoliko manjšo koncentracijo smo izmerili v gojišču z vrednostjo pH 7,5. V gojišču z neuravnano vrednostjo pH in vrednostjo pH 8,0 je bila končna koncentracija acetata po 24. urah približno 2-krat nižja kot v ostalih dveh gojiščih.



Slika 22: Specifična produktivnost etanola pri transformanti kFPFK-M, ki je rasla na gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.

Graf specifične produktivnosti etanola (Slika 22) nam pokaže, kakšna je bila produkcija etanola v eni uri na gram suhe teže. Po 1. uri gojenja so bile pri vseh tipih gojišč specifične produktivnosti etanola visoke, nato pa so s časom upadale. Največja specifična produktivnost etanola je bila pri gojenju v gojišču z vrednostjo pH 7,0 po 1., 2. in 5. uri gojenja, medtem ko so bile specifične produktivnosti etanola po 3. uri v ostalih gojiščih relativno majhne. Začetna hitrost kopičenja etanola pri transformanti kFPFK-M je dosegla vrednost 2,5 g etanola na g suhe teže celic na uro, kar je z biotehnološkega vidika izredno visoka specifična produktivnost.



Slika 23: Specifična produktivnost acetata pri transformanti kfPFK-M, ki je rasla na gojišču Sc-ura- Glk 2,5 %.

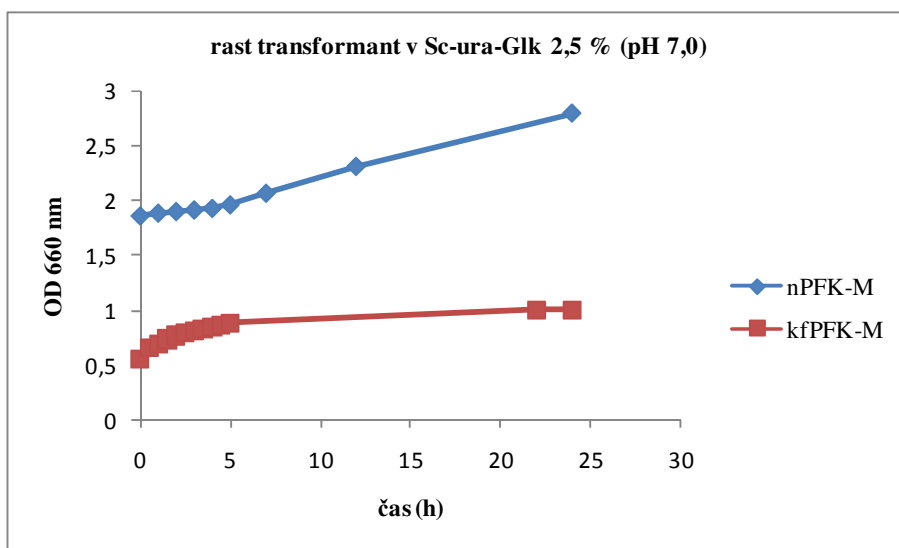
Glede na izmerjene visoke koncentracije acetata pri vseh tipih gojišč je bila specifična produktivnost acetata precej manjša, v primerjavi s produkcijo etanola, in je v najbolj produktivnem okolju pri vrednosti pH 8,0 dosegla vrednost 0,25 g acetata na g suhe teže na uro (Slika 23). Specifične produktivnosti v prvih urah gojenja so bile pri vseh tipih gojišč podobne in v 1. uri visoke, nato pa je produktivnost padla. Najmanjša specifična produkcija po 3. uri je bila pri transformanti, gojeni v gojišču z neuravnano vrednostjo pH in z vrednostjo pH 8,0 ter po 24. uri tudi v gojišču z vrednostjo pH 7,5. Gojenje v gojišču z vrednostjo pH 7,0 je skozi celoten čas meritev omogočilo pozitivno specifično produkcijo. Največja specifična produktivnost je bila pri vrednosti pH 8,0, nato pri pH 7,5 in 7,0, v nezapufranem gojišču pa ni bilo skoraj nič specifične produkcije acetata.

4.5 PRODUKCIJA ZUNAJCELIČNIH METABOLITOV IN RAST TRANSFORMANT nPFK-M IN kfPFK-M NA ZAPUFRANEM GOJIŠČU SC-URA- GLK 2,5 %

Glede na ugotovitve, da je bila rast in produkcija zunajceličnih metabolitov največja v primeru gojišča z uravnano vrednostjo pH, smo se odločili, da bomo spremljali rast in vsebnost zunajceličnih metabolitov v zapufranem gojišču z vrednostjo pH 7,0 pri obeh transformantah.

4.5.1 Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0)

Vrednost pH smo v gojiščih uravnali z dodatkom pufru HEPES (pH 7,2) s koncentracijo 100 mM. Vrednost pH v gojiščih smo naravnali do vrednosti pH 7,0 s pomočjo pH-metra.

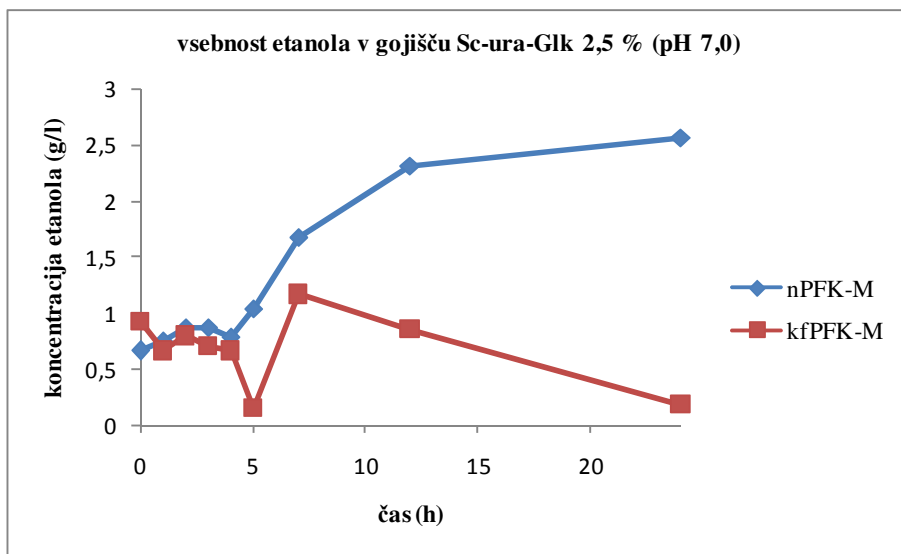


Slika 24: Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).

Rezultati, podani s sliko 24, kažejo na to, da je transformanta nPFK-M veliko bolje rasla kot transformanta kfPFK-M, ki je v začetnih urah gojenja hitro rasla, nato pa se je rast ustavila oziroma je bila ves čas meritve konstantna. Rast transformanti nPFK-M je naraščala in se po 24. urah ni ustavila.

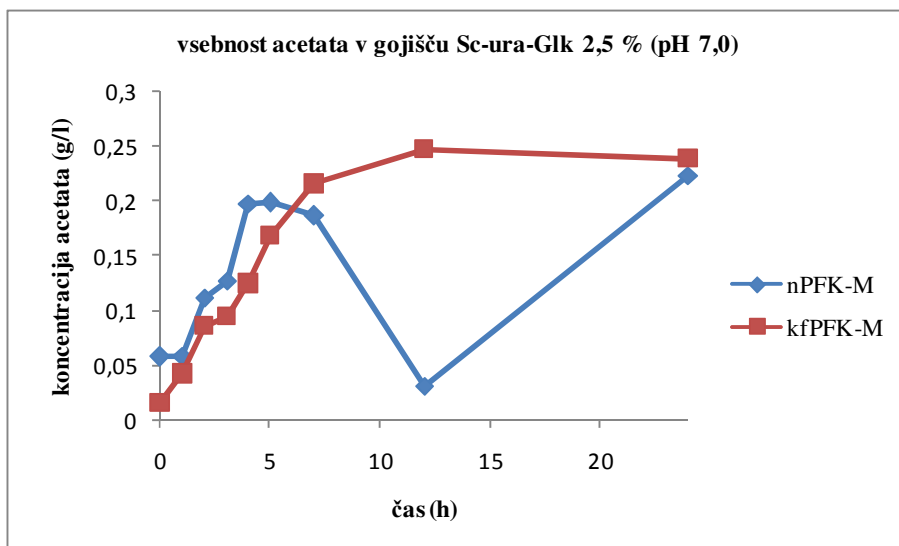
4.5.2 Produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0)

Glede na različno rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0) nas je naprej zanimalo, kakšna je vsebnost metabolitov pri eni in drugi transformanti in ali pride do kakšnih razlik.



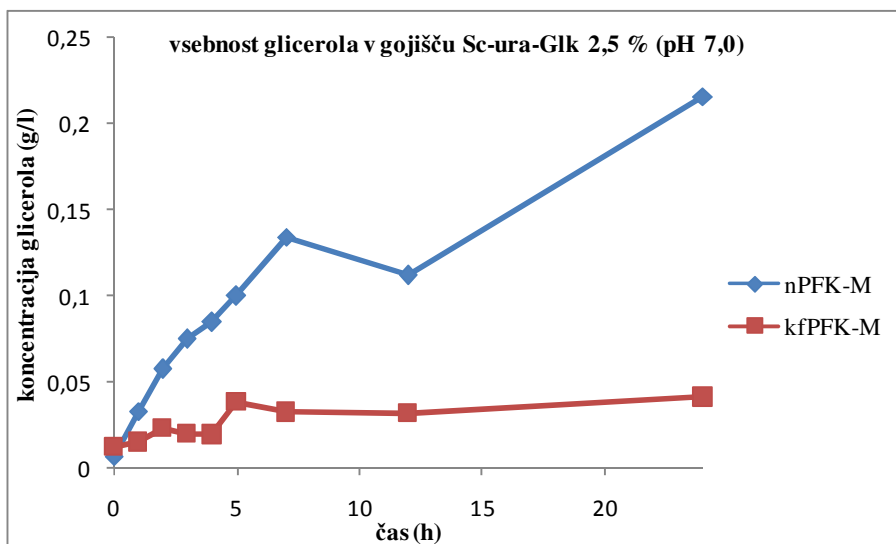
Slika 25: Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.

Vsebnost etanola je bila pri nPFK-M nizka v začetnih urah, ko so se celice prilagajale na gojišče (Slika 25). Nato se je po 5. uri pri nPFK-M transformanti količina etanola povečala. Če primerjamo transformanti med sabo, se nivoja etanola v gojišču močno razlikujeta. Pri transformanti nPFK-M, kjer je bila prisotna tudi rast, je bila koncentracija etanola v začetku meritev zanemarljiva, vendar je naraščala do konca meritev. Pri transformanti kfPFK-M je bila sprva vsebnost etanola zelo visoka, nato pa je upadla in postala neznatna.



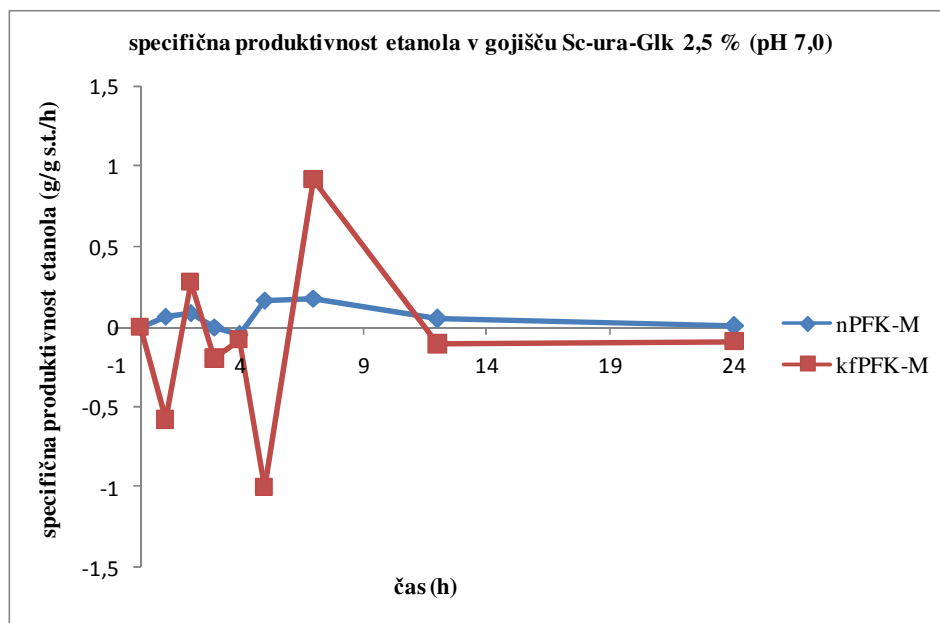
Slika 26: Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).

Rezultati, prikazani s sliko 26, kažejo na to, da je bilo prisotno povečano izločanje acetata že od začetka izvajanja meritev. Če primerjamo transformanti v začetnih urah meritev, ugotovimo, da je bila produkcija acetata zelo različna. Ob prenosu celic iz predstopnje rasti v Sc-ura-malt 1 % v glukozno gojišče je bila koncentracija acetata majhna. Nato pa se je pri obeh transformantah začela koncentracija acetata strmo večati do 5. ure. Pri transformanti nPFK-M je začela koncentracija upadati, pri transformanti kfPFK-M pa je koncentracija naraščala do konca meritev. Po 24. urah sta bili pri obeh transformantah koncentraciji acetata izenačeni.



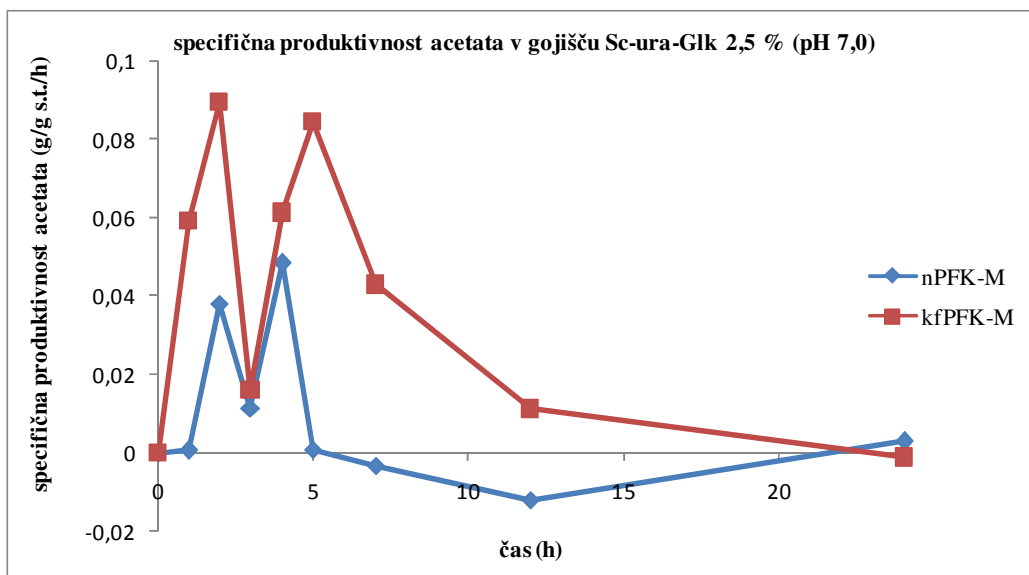
Slika 27: Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 %.

Glicerol se prav tako kot etanol in acetat izloča v gojišče (Slika 27). Rezultati koncentracij glicerola v gojišču kažejo, da se je prav tako kot pri etanolu pri transformanti nPFK-M nakopičilo veliko več glicerola, kot pri transformanti kfPFK-M. Transformanta kfPFK-M je izločala zelo majhne koncentracije glicerola (0,03 g/l), medtem ko je transformanta nPFK-M izločala 4-krat višje koncentracije glicerola (0,12 g/l) v gojišče.



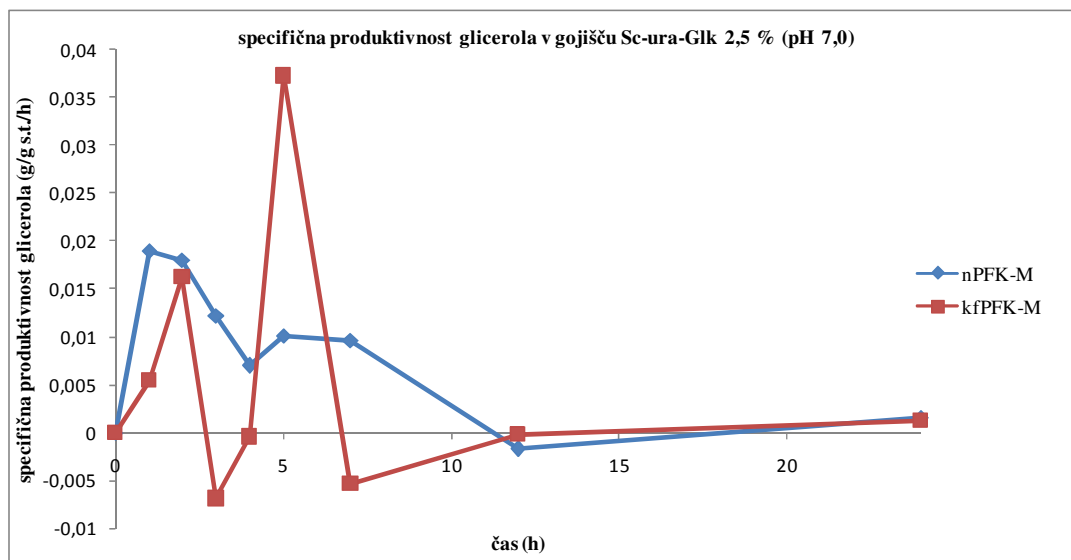
Slika 28: Specifična produktivnost etanola pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).

Če pogledamo graf specifične produktivnosti etanola (Slika 28), ugotovimo, da sta specifični produktivnosti obeh transformant različni. Bistveno se razlikujeta v času 5 ur, ko je bila specifična produktivnost transformante kfPFK-M večja kot pri transformanti nPFK-M, ne glede na to, da je bila produkcija etanola v tej točki pri transformanti kfPFK-M sicer slabša.



Slika 29: Specifična produktivnost acetata pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura- Glk 2,5 % (pH 7,0).

Specifična produktivnost acetata je bila v celoti večja pri transformanti kfPFK-M od specifične produktivnosti pri transformanti nPFK-M (Slika 29). Najvišja specifična produktivnost pri transformanti kfPFK-M je bila v začetnih urah meritev in sicer sta prisotna dva vrhova najvišje specifične produktivnosti pri 2. in 5. uri. Krivulja specifične produktivnosti pri transformanti nPFK-M je po obliki zelo podobna krivulji transformante kfPFK-M, vendar so vrednosti pri prvi precej nižje.



Slika 30: Specifična produktivnost glicerola pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % (pH 7,0).

Koncentracije glicerola v gojišču so se pri obeh transformantah zelo razlikovale (Slika 30). Transformanta kfPFK-M je izločila precej manj glicerola kot transformanta nPFK-M. Rezultati specifične produktivnosti glicerola kažejo, da sta si specifični produkciji glede na zelo različne koncentracije glicerola v nekaterih delih zelo podobni. Najbolj sta si podobni v začetnem in končnem delu meritev, vmes pa se razlikujeta. Najbolj je opazna razlika v 5. uri, ko je bila specifična produkcija glicerola pri transformanti kfPFK-M veliko večja kot pri transformanti nPFK-M.

Pri interpretaciji izmerjenih vrednosti etanola, acetata in glicerola moramo vedeti, da je bila količina biomase pri transformanti nPFK-M bistveno večja kot pri transformanti kfPFK-M. Poleg tega je prva transformanta normalno rasla, druga pa slabo.

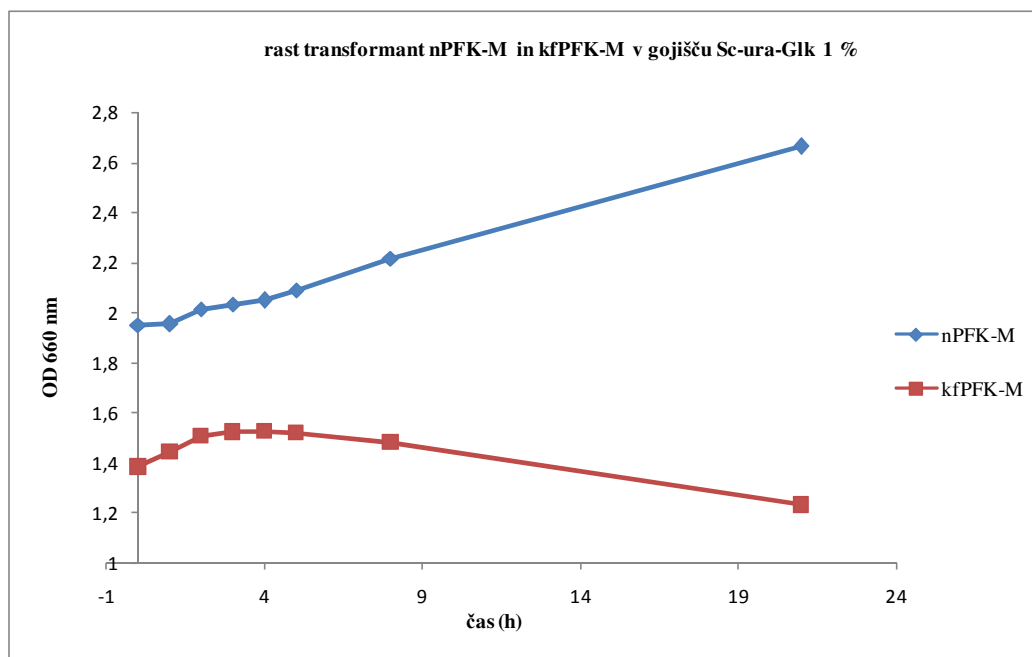
4.6 PRODUKCIJA ZUNAJCELIČNIH METABOLITOV IN RAST TRANSFORMANT nPFK-M IN kfPFK-M PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH SLADKORJEV

Zaradi zgoraj omenjenih rezultatov smo našo pozornost v raziskovanju usmerili še na ostale koncentracije glukoze. Zanimalo nas je, kakšna je produkcija zunajceličnih

metabolitov in rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojiščih z vrednostjo pH 7,0 z dodanimi različnimi deleži glukoze. V gojišča smo dodali 1 %, 5 % in 10 % glukoze ter spremljali rast in izločanje zunajceličnih metabolitov pri obeh transformantah. Dobljene rezultate smo primerjali med seboj.

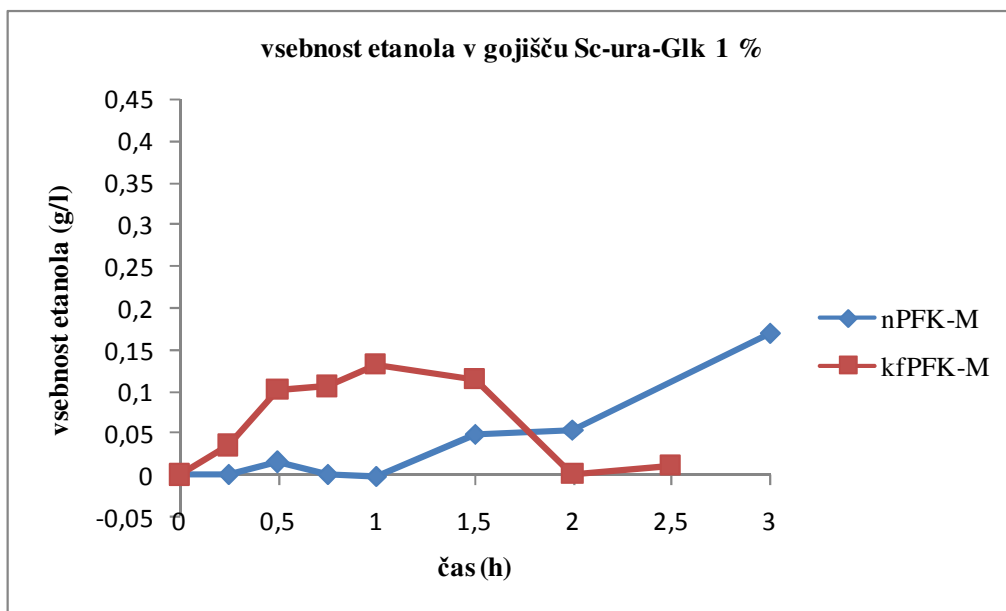
4.6.1 Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M ter produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanim 1 % glukoze

Glede na rast transformant v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % nas je nadalje zanimala rast v gojišču z manjšo koncentracijo glukoze (Slika 31). Istočasno smo spremljali produkcijo zunajceličnih metabolitov. Vsebnost etanola je bila pri obeh transformantah v tem gojišču majhna in na meji detekcije (Slika 32), rezultati vsebnosti acetata in glicerola pa so predstavljeni na slikah 33 in 34.

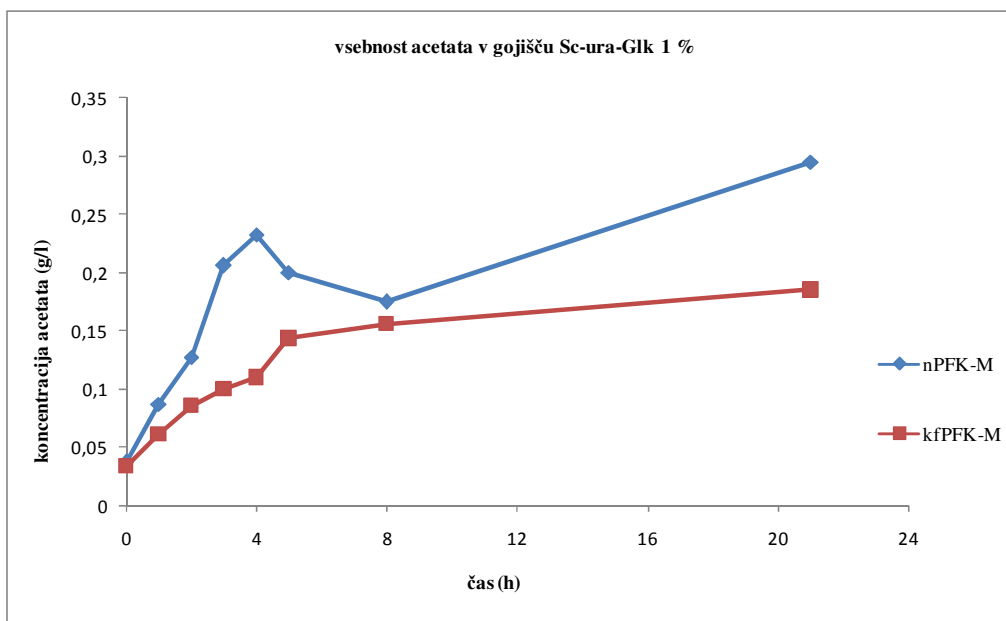


Slika 31: Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).

Rast transformante nPFK-M je bila v gojišču Sc-ura-Glk 2,5 % naraščajoča do konca meritev, medtem ko je rast transformante kfPFK-M sprva naraščala, nato pa je po 3 urah začela upadati (Slika 31).



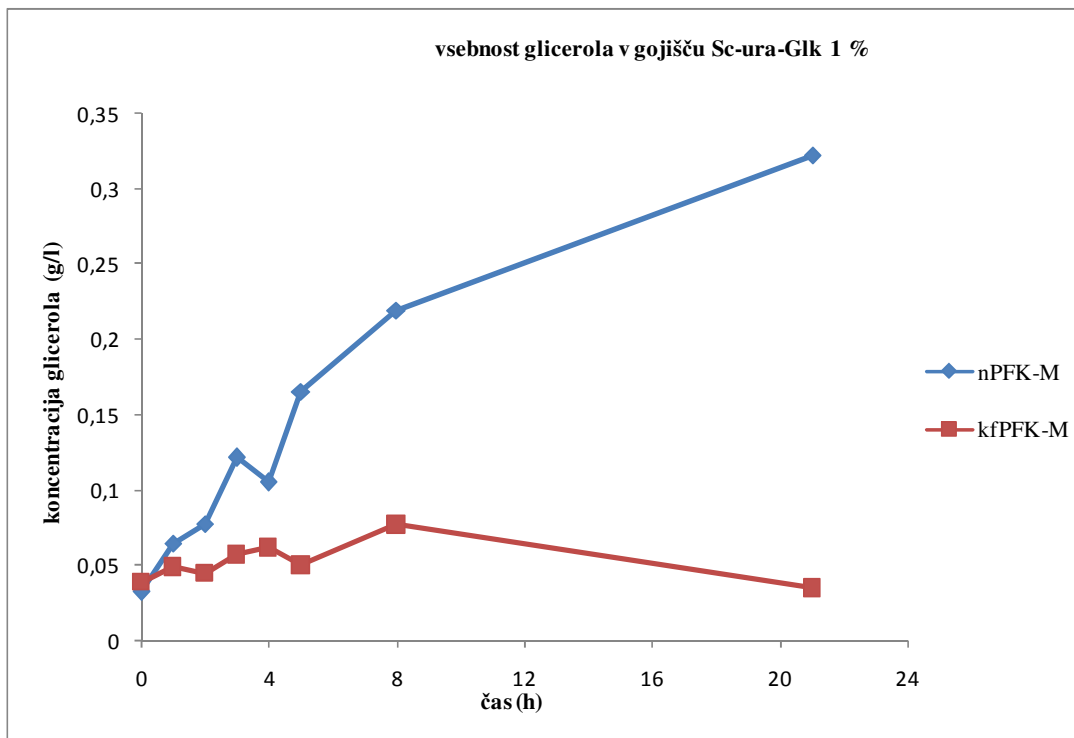
Slika 32: Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).



Slika 33: Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).

Primerjali smo vsebnost acetata med obema transformantama in ugotovili, da je bila vsebnost acetata večja v vseh točkah meritev pri transformanti nPFK-M v primerjavi s

transformanto kfPFK-M (Slika 33). Vendar je biomasa pri transformanti nPFK-M večja kot pri transformanti kfPFK-M in potemtakem niti ni bistvene razlike v specifični produktivnosti med obema transformantama. Vsebnost acetata je strmo naraščala pri obeh do 4. ure, nato pa se je počasi povečevala do konca meritev. Pri transformanti nPFK-M je bil po 4. uri upad koncentracije acetata, ki se je ponovno zvišala po 7. uri meritev.

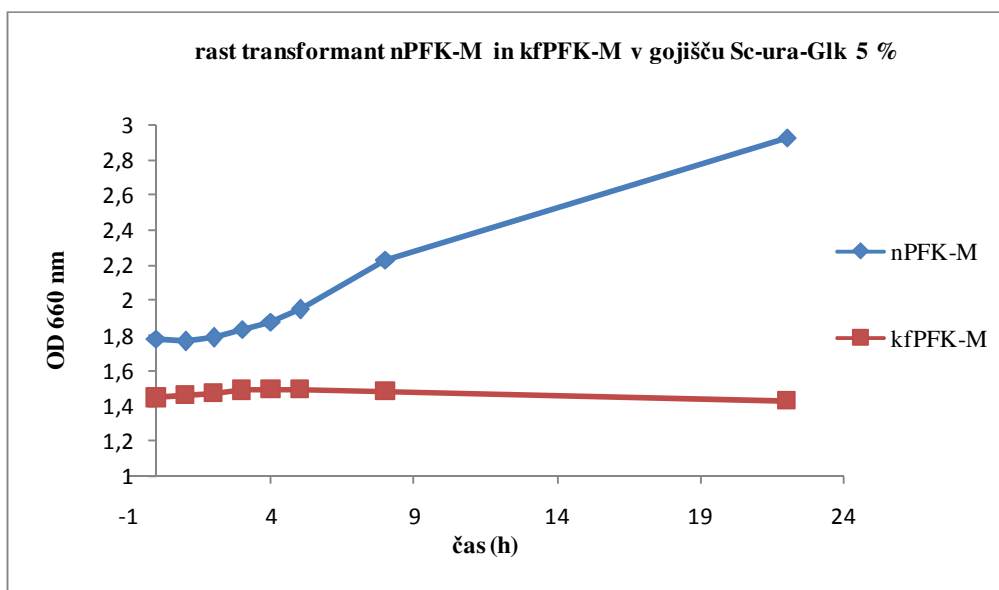


Slika 34: Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 1 % (pH 7,0).

Količina glicerola v gojišču je bila precej večja pri transformanti nPFK-M kot pri transformanti kfPFK-M, kjer je vsebnost glicerola sprva naraščala, nato pa se ni več povečevala (Slika 34). Nasprotno se je pri transformanti nPFK-M vsebnost glicerola povečevala ves čas meritev. Vsebnost glicerola je bila na koncu meritev pri transformanti nPFK-M približno 10-krat večja kot pri transformanti kfPFK-M.

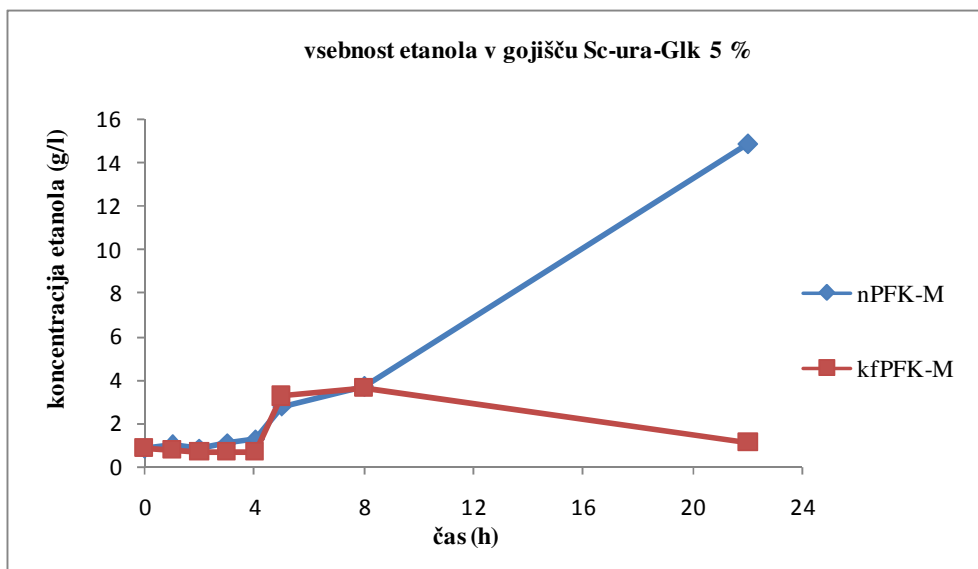
4.6.2 Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M ter produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanimi 5 % glukoze

Rast in produkcijo metabolitov smo spremljali pri višji vsebnosti glukoze v gojišču. Zanimala nas je razlika v rasti in izločanju metabolitov v primerjavi z manjšimi vsebnostmi glukoze v gojišču.



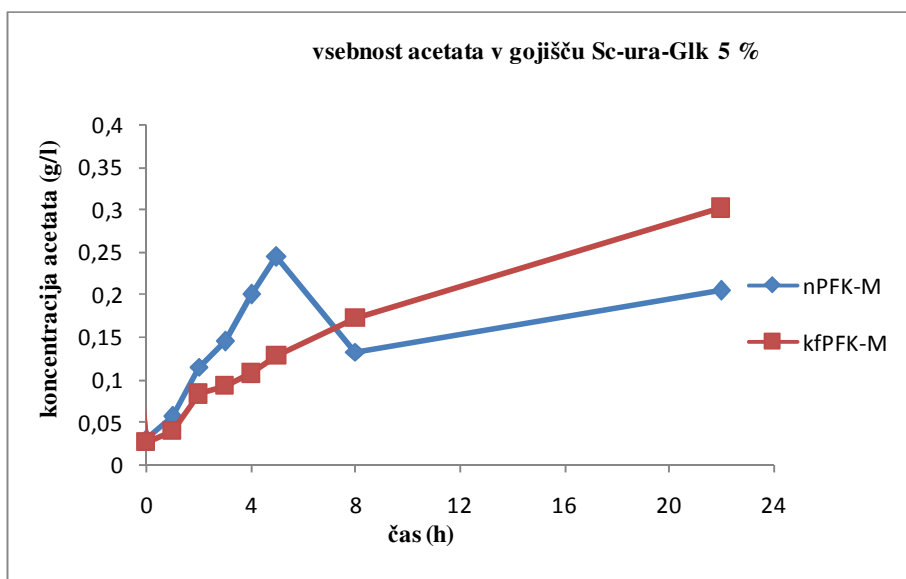
Slika 35: Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).

Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M je zelo podobna kot v primeru uporabe manjših koncentracij glukoze v gojišču (Slika 35). Rast transformante kfPFK-M je bila tudi v tem primeru skoraj popolnoma zavrta, medtem ko je transformanta nPFK-M uspešno rasla in se ji je rast tekom meritev povečevala. Glede na rastno krivuljo nas je zanimala vsebnost metabolitov v gojišču.



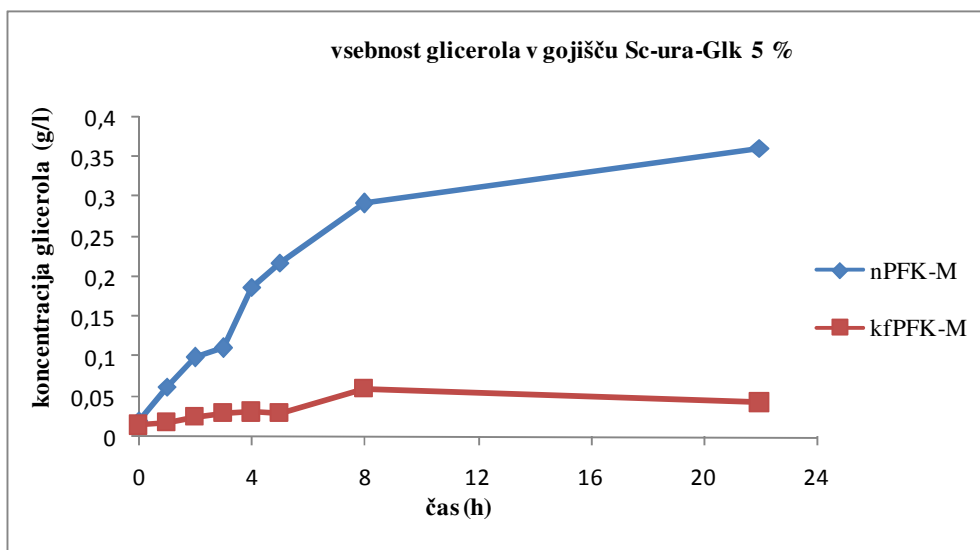
Slika 36: Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).

Vsebnost etanola v gojišču je bila v začetnih urah meritev pri obeh transformantah zelo podobna (Slika 36). V primerjavi z gojišči z nižjo vsebnostjo glukoze gre v tem primeru za visoke koncentracije etanola v gojišču. Vklapl se je t. i. Crabtree efekt, ki stimulira tvorbo in izločanje etanola iz celic.



Slika 37: Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).

Koncentracija acetata v gojišču je od začetka do 5. ure meritev naraščala pri obeh transformantah (Slika 37). Nato je pri transformanti kfPFK-M koncentracija acetata v gojišču še naprej naraščala in zato slaba rast transformante kfPFK-M. Pri transformanti nPFK-M pa se je po 5. uri vsebnost acetata v gojišču zmanjšala oziroma ni več naraščala.

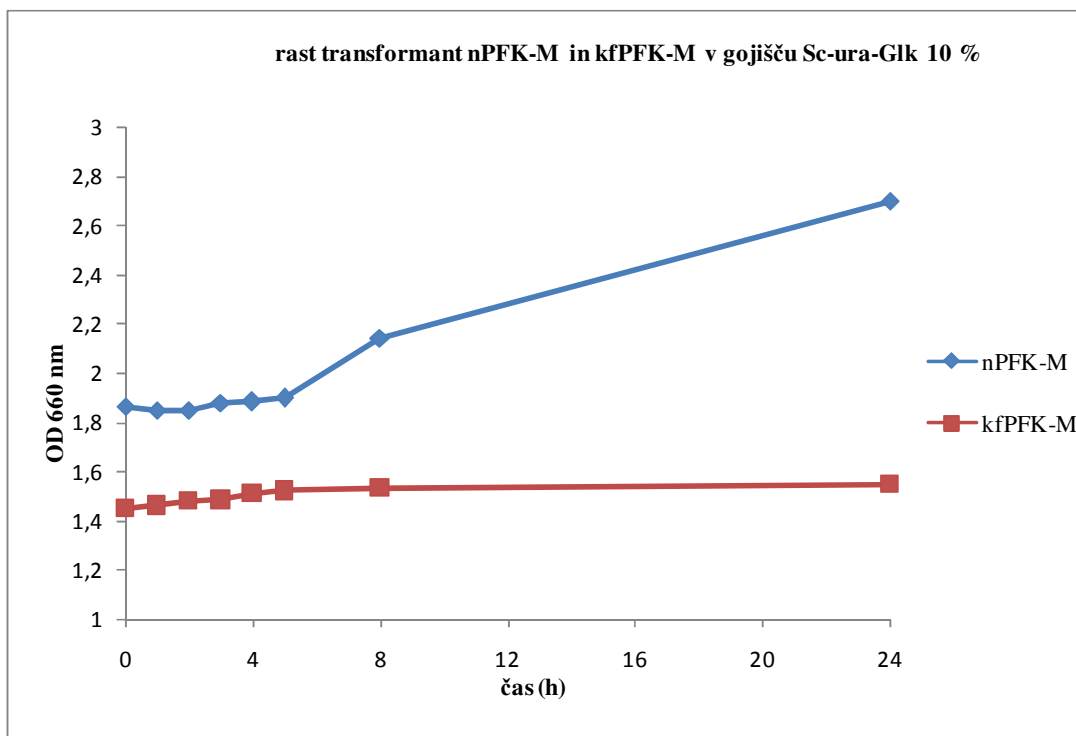


Slika 38: Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 5 % (pH 7,0).

Vsebnost glicerola v gojišču se je med transformantama zelo razlikovala (Slika 38). Pri transformanti nPFK-M je koncentracija glicerola v gojišču naraščala od prve do zadnje meritve. Najbolj hitro naraščanje koncentracije je bilo v prvih 5 urah. Pri transformanti kfPFK-M je bila vsebnost glicerola tekom celotnega časa meritev slaba.

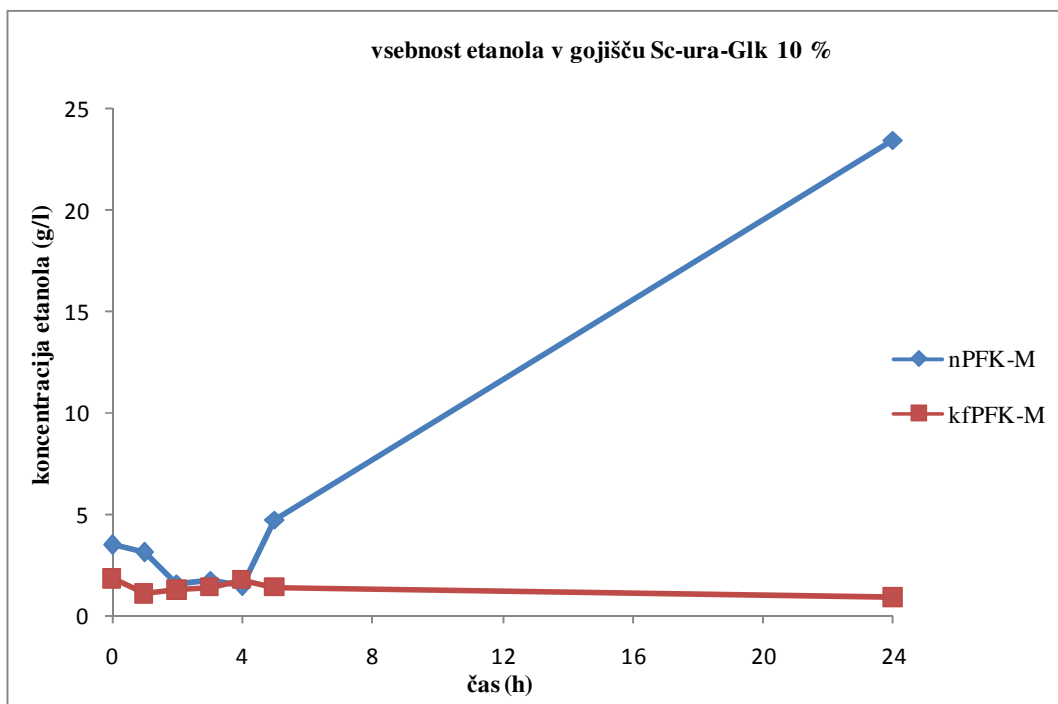
4.6.3 Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M ter produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanimi 10 % glukoze

Želeli smo preveriti, ali se rast in produkcija zunajceličnih metabolitov v gojišču z dodanimi 10 % glukoze v čem razlikuje od rasti in vsebnosti metabolitov v gojišču z dodanimi 5 % glukoze.



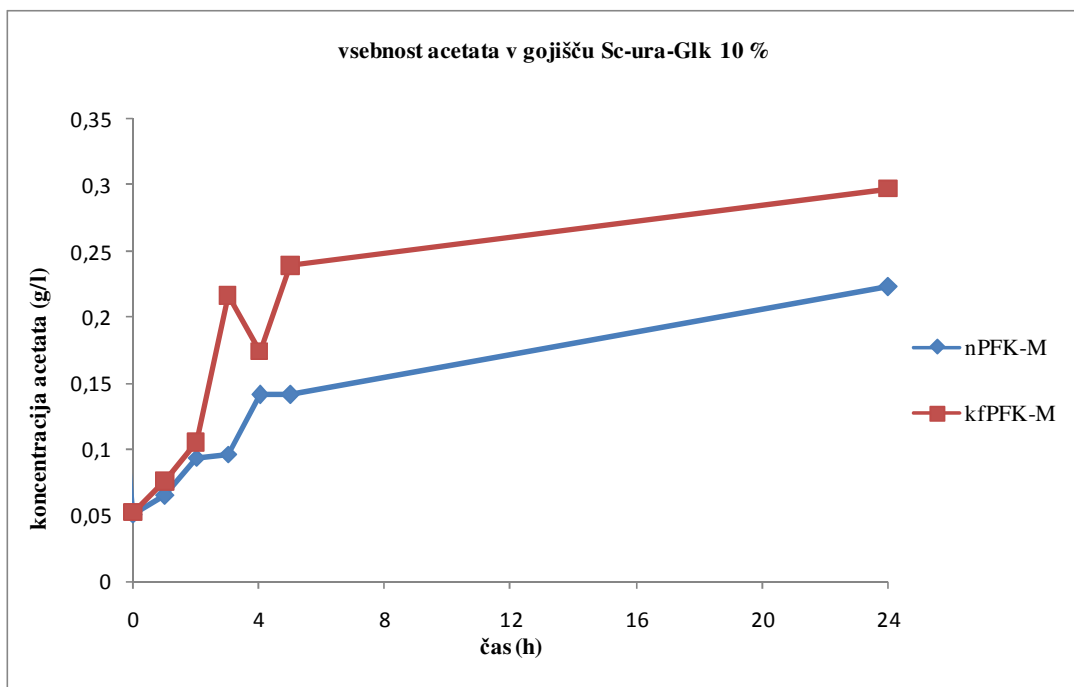
Slika 39: Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).

Krivulja rasti transformant v gojišču z 10 % glukoze je zelo podobna krivulji rasti v gojišču s 5 % glukoze (Slika 39). Prav tako tukaj ni rasla transformanta kfPFK-M, medtem ko je bila rast transformante nPFK-M uspešna in je naraščala tekom meritev. Na rast transformant vplivajo zunajcelični metaboliti in dolga lag faza pri transformanti nPFK-M.



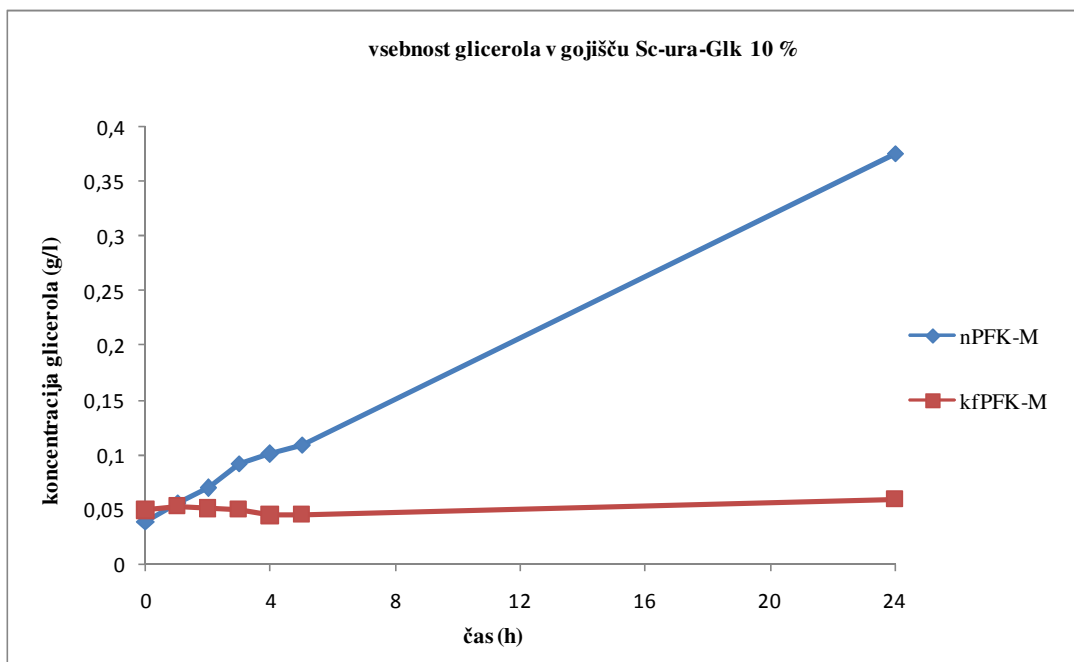
Slika 40: Vsebnost etanola v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).

Vsebnost etanola v gojišču je bila v primerjavi z vsebnostmi etanola v gojišču pri ostalih deležih glukoze v primeru 10 % glukoze zelo velika (Slika 40). Začetni koncentraciji etanola sta bili pri obeh transformantah zelo podobni. Pri transformanti kfPFK-M je koncentracija etanola dosegla maksimalno vrednost 1,79 g/l že takoj na začetku, pri transformanti nPFK-M pa je bila maksimalna koncentracija 23,4 g/l po 24 urah. Pri tem deležu glukoze v gojišču smo pričakovali visoke vrednosti etanola pri obeh transformantah zaradi vključitve Crabtree efekta.



Slika 41: Vsebnost acetata v gojišču pri transformantah nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).

Vsebnost acetata v gojišču je bila v začetnem delu meritev drugačna od vsebnosti acetata pri 5 % glukoze v gojišču (Slika 41). Vendar na koncu pri obeh tipih gojišča doseže zelo podobno vrednost. Prav tako so celice transformante kfPFK-M v vseh točkah meritev izločile acetat v večjih koncentracijah kot pa celice transformante nPFK-M.



Slika 42: Vsebnost glicerola v gojišču pri transformantih nPFK-M in kfPFK-M v gojišču Sc-ura-Glk 10 % (pH 7,0).

Vsebnost glicerola v gojišču z 10 % glukoze je prav tako zelo podobna vsebnosti glicerola v gojišču s 5 % glukoze (Slika 42). Pri transformanti nPFK-M je mnogo večja koncentracija glicerola že v začetnih fazah meritev, nato pa se na koncu celo občutno poveča. Pri transformanti kfPFK-M je vsebnost glicerola v vseh točkah meritev zelo slaba.

4.6.4 Ocena specifičnih hitrosti rasti in produktivnosti metabolitov pri 1 %, 2,5 %, 5 % in 10 % začetne koncentracije glukoze v gojiščih

Ocena specifične hitrosti rasti in produktivnosti, kot je prikazana v preglednicah 16 in 17 je razvidna iz slik št. 24-42.

Preglednica 16: Specifična hitrost rasti in specifična produktivnost transformante nPFK-M med rastjo v gojiščih z različno začetno koncentracijo glukoze.

Parameter	1 % glukoze	2,5 % glukoze	5 % glukoze	10 % glukoze
Rast	+	++	+++	+
Etanol	-	±	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 16: Specifična hitrost rasti in specifična produktivnost transformante nPFK-M med rastjo v gojiščih z različno začetno koncentracijo glukoze.

Parameter	1 % glukoze	2,5 % glukoze	5 % glukoze	10 % glukoze
Acetat	+	+	+	+
Glicerol	+++	++	+++	+

Legenda: +++ močna specifična produktivnost in rast
 ++ srednje močna specifična produktivnost in rast
 + slaba specifična produktivnost in rast
 - ni specifične produktivnosti in rasti

Pri transformanti nPFK-M specifična hitrost rasti narašča od najnižje proti višjim začetnim koncentracijam glukoze v gojišču (Preglednica 16). Največja hitrost rasti je pri 5 % začetne koncentracije glukoze. Glede izločanja metabolitov je najmočnejša specifična produkcija pri glicerolu, medtem ko je pri acetatu in etanolu pri vseh začetnih koncentracijah glukoze slaba.

Preglednica 17: Specifična hitrost rasti in specifična produktivnost transformante kfPFK-M med rastjo v gojiščih z različno začetno koncentracijo glukoze.

Parameter	1 % glukoze	2,5 % glukoze	5 % glukoze	10 % glukoze
Rast	±	+	-	-
Etanol	++	+++	-	-
Acetat	+	++	++	+++
Glicerol	±	+	±	±

Legenda je enaka kot pri preglednici 16.

Pri transformanti kfPFK-M je prisotna slaba specifična hitrost rasti v gojiščih z nizko začetno koncentracijo glukoze, medtem ko pri višjih začetnih koncentracijah glukoze rasti ni (Preglednica 17). Specifična produkcija etanola je visoka pri nizkih začetnih koncentracijah glukoze v gojišču, vendar se etanol izloča iz celic le med prvimi nekaj

urami po prenosu v glukozno gojišče. Specifična produkcija acetata je najmočnejša pri 10 % glukoze. Specifična produkcija glicerola pa je slaba pri vseh koncentracijah glukoze.

Če primerjamo transformanti med seboj, opazimo, da se razlikujeta v specifični hitrosti rasti, kjer je specifična hitrost rasti transformante nPFK-M srednje močna do močna, medtem ko je specifična hitrost rasti pri transformanti kfPFK-M slaba ali je ni. Specifična produkcija acetata je pri vseh začetnih koncentracijah glukoze v gojišču močnejša pri kfPFK-M, prav tako je boljša specifična produktivnost etanola pri nižjih začetnih vrednostih glukoze v gojišču pri kfPFK-M.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rak je ena najbolj pogostih bolezni in vsako leto se število obolelih za katerokoli vrsto raka poveča. Kljub dobri preventivi in možnostim zdravljenja postaja rak v razvitem svetu glavni vzrok smrti, takoj za boleznimi srca in ožilja (Ferlay in sod., 2006).

Za rakaste celice je značilno, da glukozo porabljajo veliko hitreje kot normalne celice. Približno 85 % glukoze pretvorijo ob prisotnosti kisika v laktat, ki ga izločajo iz celic. Temu pojavu pravimo Warburgov efekt (Vander Heiden, 2009).

Namena diplomskega dela sta bila dva. Želeli smo proučiti vpliv humanega kratkega fragmenta mišičnega tipa encima PFK na metabolizem pri pivski kvasovki, v primerjavi z nativnim humanim encimom PFK-M. Drug namen je bil ugotoviti, ali bo izražanje gena, ki kodira visoko aktivni kratki fragment PFK-M, pri transformantah pivske kvasovke *S. cerevisiae*, ki ima izbite lastne gene za encime PFK, v celici induciralo fiziološko stanje, podobno Warburgovemu efektu pri raku. Želeli smo določiti pogoje pri kvasovki, kjer bi dobili psevdo-Warburgov efekt.

Transformante, ki smo jih uporabili pri diplomskem delu, so bile pripravljene v sklopu dveh, še neobjavljenih, diplomskih nalog. Pri teh dveh diplomskih nalogah so testirali transformante in določili nukleotidno zaporedje. Transformante so last mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Transformante smo testirali na prisotnost aktivnih encimov PFK, ki so bili prisotni pri obeh transformantah, nPFK-M in kfPFK-M, ki smo jih uporabljali za nadaljnje analize. Vrednosti encimske aktivnosti pri transformanti kfPFK-M so bile bistveno manjše kot pri transformanti nPFK-M. Znano je, da je kratki fragment PFK-M nestabilen in v razredčenem okolju, čemur ustreza pufer za merjenje encimske aktivnosti, hitro izgublja aktivnost (Šmerc in sod., 2011).

Aktivnost enega in drugega encima smo testirali tudi ob prisotnosti F26bP, ki je močan aktivator encima PFK. Po raziskavah sodeč, je vsebnost aktivatorja F26bP visoka tudi v tumorjih. Dodatek F26bP v sistem z encimoma nPFK-M in kfPFK-M je spremenil saturacijsko krivuljo aktivnosti obeh encimov iz sigmoidne v krivuljo Michaelis-Mentenove kinetike. Značilen je bil hiter porast aktivnosti obeh encimov pri transformanti *E. coli*, v odvisnosti od koncentracije substrata F6P. F26bP je kot aktivator povečal afiniteto obeh encimov do substrata in značilno povečal maksimalno hitrost $V_{\max}$ pri kfPFK-M, medtem ko tega efekta niso zasledili pri nPFK-M (Šmerc in sod., 2011). Tudi v našem primeru merjenja encimskih aktivnosti smo prišli do podobnega zaključka. F26bP pri nPFK-M je povečala le afiniteto encima do substrata, medtem ko je pri kfPFK-M povečala tako afiniteto kot tudi $V_{\max}$.

Kvasovke običajno živijo v okolju z različnimi viri ogljikovih hidratov, katerih koncentracija ni stalna, tako kot je pri celicah v večceličnem organizmu. Enako velja tudi za tumorske celice. Kljub temu kvasovke najprej uporabijo glukozo ali saharozo, ki predstavljata preferenčna vira ogljikovih hidratov. Prisotnost teh dveh sladkorjev pa sproži zavrtje glukoneogeneze (tvorba trehaloze), gliksilatnega cikla in respiracije (pojav Crabtree efekta) ter onemogoča privzem alternativnih virov ogljikovih hidratov (npr. maltoze) (Verstrepen in sod., 2004). Rast vseh transformant smo spremljali na ploščah z dodanimi različnimi sladkorji, kot viri ogljikovih hidratov. Najboljša rast vseh transformant je bila na gojišču z dodano maltozo, medtem ko ni bilo rasti transformant kfPFK-M na gojišču z glukozo. Maltoza je disaharid iz dveh enot glukoze, ki se s hidrolizo počasi sproščajo v citosolu. Do razlike v rasti na gojiščih z dvema različnima sladkorjema bi lahko prišlo zaradi metabolnega stresa, ki ga povzroča glukoza kot monosaharid, medtem ko gre pri maltozi za počasno sproščanje glukoznih enot in je stres manjši. Glukoza med drugim namreč povzroča tudi manjšo odpornost proti celičnemu stresu (Verstrepen in sod., 2004).

Koncentracija glukoze in nivo intermediatov glikolize regulirata delovanje več glukoznih transporterjev in ekspresijo nekaterih glikolitičnih genov, tako da se prepreči privzem alternativnih virov ogljikovih hidratov, kot sta galaktoza in maltoza. Če v mediju ni prisotne glukoze, se transkripcijski represor ne veže na tarčne promotorje in omogočen je

privzem drugih virov ogljikovih hidratov. Glukoza pri kvasovkah dejansko deluje kot hitra prehrana za celice, istočasno pa tudi kot hormon oziroma rastni faktor, ki vklopi katabolno represijo. Ob povečani koncentraciji glukoze se sprožita dve signalni poti: pot Ras/cAMP/PKA in pot katabolne represije. Glukoza posredno po poti cAMP/PKA (ciklični adenzin-monofosfat/protein kinaza A pot) pospeši mehanizme, ki privedejo do hitrejše rasti celic (Verstrepen, 2004). Pri kvasovkah proteini Ras regulirajo signalno pot cAMP/PKA, ki je vključena v mnoge fiziološke prilagoditve celic na spremembe v okolju. Te spremembe vključujejo diauksično rast, odgovor na pomanjkanje hranil in oksidativen stres (Diaz-Ruiz in sod., 2011). Aktivacija poti zahteva dvojni signal. Najprej znotrajcelična fosforilacija glukoze do glukoze-6-fosfata poveča aktivnost adenilat ciklaze Cyr1. Nato pa z G-proteini povezani receptorji zaznajo zunajcelično koncentracijo glukoze ali saharoze. Ta drugi signal močno aktivira Cyr1, ki poveča količino cAMP v celici. cAMP se nato veže na regulatorno podenoto PKA (Bcy1) in sproži disociacijo regulatorne (Bcy1) in katalitične (Tpk) podenote PKA. Proste kinaze Tpk pa nato fosforilirajo različne tarčne proteine, ki naj bi vodili do prilagoditve na visoke koncentracije glukoze. Pot Ras/cAMP/PKA kontrolira ekspresijo različnih genov, vključenih v metabolizem, proliferacijo in odpornost proti stresu (Verstrepen in sod., 2011). Pri odpornosti proti stresu sodelujejo geni, ki kodirajo proteine heat-shock (Hsp). Slednji pomagajo kvasovkam, da se soočajo z različnimi vrstami stresa, med katere spada tudi metabolni stres. Proteini Hsp so ena izmed tarč signalne poti Ras/cAMP/PKA. To pot sproži le zunajcelična koncentracija glukoze ali saharoze, medtem ko je maltoza ne sproži. Iz literature je znano, da na splošno visoke koncentracije sladkorjev pri kvasovkah ne povzročajo velikih problemov v celicah, vendar v določeni stopnji industrijskega procesa, kot je na primer varjenje piva, lahko hitro in dolgoročno zmanjšajo stopnjo fermentacije. Kljub temu, da celice preferenčno izbirajo glukozo in saharozo pred ostalimi viri ogljikovih hidratov, pa lahko prevelika količina glukoze in saharoze negativno vpliva na njihov metabolizem (Verstrepen in sod., 2004). V skrajnem primeru lahko metabolni stres zaradi prevelike koncentracije glukoze povzroči odmiranje celic. Druga pot je pot katabolne represije z glukozo, ki vpliva na transporterje glukoze in glikolitične gene. Obe poti posledično povzročita represijo respiracije, omejen privzem drugih ogljikovih hidratov in izgubo celične odpornosti proti stresu. Negativen vpliv katabolne represije se kaže v tem, da se zmanjša tvorba biomase in tvori se etanol, ki

predstavlja dodaten stres za celice. Ko celice porabijo glukozo v gojišču, se morajo prilagoditi in preklopiti na privzem drugih ogljikovih hidratov (Verstrepen in sod., 2004). Preden smo testirali rast transformant v gojišču z glukozo, smo morali celice namnožiti do določene gostote (OD_{660nm} 0,6). V ta namen smo preizkusili dve gojišči. V gojišču z dodano maltozo so celice že prilagojene s sintezo ustreznih encimov za uporabo glukoze, medtem ko se v gojišču z nefermentativnima viroma ogljika, kot sta etanol in glicerol, celice niso prilagodile s sintezo encimov na izrabo glukoze. Pri prenosu celic iz gojišča z etanolom in glicerolom v gojišče z glukozo je bil torej stres za celice močnejši kot pri prenosu iz gojišča z maltozo v gojišče z glukozo. Geni za glikolitične encime so bili v gojišču z maltozo inducirani in encimi za uporabo glukoze naj bi bili že sintetizirani v predstopnji rasti. Prehod v gojišče z glukozo je tako za celice povzročal manjši stres, kar potrjujejo tudi rezultati rasti (Sliki 17 in 24) in preživetja celic (Slika 18).

Odmiranj celic smo spremljali v glukoznem gojišču takoj po prenosu celic iz maltoznega gojišča, kot tudi po prenosu iz gojišča z glicerolom in etanolom (Sc-ura-GE). Rezultati odmiranja celic v glukoznem gojišču po prenosu iz maltoznega kažejo na umiritev odmiranja po določenem času (Slika 18), kar pa ne velja v primeru predstopnje rasti v gojišču Sc-ura-GE (Slika 15). Verjetno se v celicah po prenosu iz maltoznega v glukozno gojišče vklopijo varnostni mehanizmi, ki poskušajo omiliti negativni vpliv metabolnega stresa. Podobno se verjetno zgodi pri že omenjenem Crabtree efektu, kjer gre za inhibicijo respiracije s povečano koncentracijo F16bP ter posledično zmanjšanje produkcije RKZ. F16bP zmanjša aktivnost kompleksa III in IV v dihalni verigi (Diaz-Ruiz in sod., 2011) in tako zniža stopnjo respiracije v mitohondrijih ter prepreči celično smrt, ki bi jo povzročilo kopičenje RKZ. Do kopičenja RKZ pride zaradi izklopljenega Crabtree efekta in povečane porabe kisika. Antioksidanti nevtralizirajo velik delež RKZ, vendar je dodatek fosfata še učinkovitejši (Lee in sod., 2011). Lee in sod. (2011) so odkrili, da fosfat ščiti celice pred celično smrtjo, inducirano s sladkorji (SICS) tako, da sproži sintezo F16bP. F16bP je zmanjšala porabo kisika v mitohondrijih pri celicah v eksponentni fazi, medtem ko celice v stacionarni fazi niso bile sposobne inhibicije mitohondrijske respiracije in oksidativne fosforilacije, kar je vodilo v celično smrt.

Do tvorbe etanola ob prisotnosti kisika pride, ko je stopnja privzema sladkorja večja od kapacitete respiratorne poti. Van Urk in sod. (1988) so odkrili, da pride pri kvasovkah *S. cerevisiae* pri povečani koncentraciji glukoze v gojišču do povečane tvorbe etanola pri 20-odstotni nasičenosti raztopljenega kisika. Metabolizem glukoze je odvisen od koncentracije glukoze v okolici. Pretvorba glukoze do etanola v aerobnih pogojih je pri nizkih koncentracijah glukoze zelo počasna in omejuje tvorbo zadostne količine energije. Z naraščanjem koncentracije glukoze v okolici narašča tudi stopnja aerobne pretvorbe glukoze v etanol. Temu pojavu pravimo Crabtree efekt. Pri koncentraciji višji od 3 % glukoze se stopnja aerobnega metabolizma glukoze zelo poveča v eksponentni fazi rasti, obenem pa se stopnja respiracije zmanjša (De Deken, 1965). Pri diplomskem delu smo najprej testirali rast transformant v gojišču z 2,5 % začetne koncentracije glukoze. Ta koncentracija je omogočala nekoliko hitrejšo rast transformant z nPFK-M kot nižje koncentracije glukoze, vendar pa še ne sproži Crabtree efekta, kar potrjujejo naši rezultati.

Pri transformantah smo med rastjo v gojiščih z različno koncentracijo glukoze spremljali izločanje zunajceličnih metabolitov, katerih povišane koncentracije lahko predstavljajo stres za celice. Meritve koncentracij zunajceličnih metabolitov smo izvedli pri vseh poskusih. Vendar smo med rastjo transformant nPFK-M in kfPFK-M v gojišču z dodanima 2,5 % glukoze določili tudi specifične produktivnosti posameznih metabolitov, zato pri ostalih sladkorjih teh rezultatov nismo prikazali in smo le ocenili specifične hitrosti rasti in produktivnosti metabolitov (Preglednica 16 in 17). V meritvah je prišlo do negativnih vrednosti specifične produktivnosti metabolitov zato, ker je bila vsebnost metabolita (g/l) v prejšnji meritvi večja kot v trenutni meritvi. Vzrok so lahko bile napake v meritvi ali pa morebiten privzem metabolita (predvsem etanola) v celice. Specifične produktivnosti posameznih metabolitov kažejo na močno nihanje v produktivnosti. Ta pojav je splošno znan pri kvasovkah. Satroudinov in sod. (1992) so v gojišču z 2,2 % in 2 % glukoze raziskovali nihanje metabolizma, pojav v katerem so se ciklično spreminjali nekateri parametri, kot so koncentracija kisika, stopnja respiracije, koncentracija acetata in etanola v mediju, koncentracije glikogena, ATP, NADH, piruvata in acetata v celici. Te spremembe naj bi bile povezane z metabolizmom glikogena. V enem ciklu nihanja oziroma oscilacije, ki je trajal 40-50 minut, sta se pojavili dve fazi: respiratorna in respiratorno-fermentativna. Ko je potekala razgradnja glikogena, se je pojavila

respiratorno-fermentativna faza, v kateri se je pod aerobnimi pogoji tvoril etanol (Crabtree efekt). Nivo znotraj celičnega piruvata in acetata je bil minimalen, količina ATP se je povečala in vrednost pH v notranjosti celice se je zmanjšala. Med respiratorno fazo, ko se je kopičil glikogen, se je etanol reasimiliriral iz medija in stopnja respiracije je narasla. Podoben pojav smo opazili tudi pri naših meritvah. Visoki specifični produktivnosti etanola po enourni rasti v gojišču z glukozo je sledil upad ter kasneje spet visoka specifična produktivnost med 4. in 5. uro meritev oziroma v 8. uri (Slika 28). S specifično produktivnostjo etanola je sovpadala tudi oscilacija v specifični produktivnosti acetata, kjer smo opazili porast specifične produktivnosti acetata prav tako po 1. uri (v času 2. ure) in med 4. in 5. uro meritev (Slika 29). Z znotrajcelično vrednostjo pH je povezan tudi cAMP, ki tekom metabolizma vpliva na aktivnost encimov. Znotrajcelično zakisanje sproži dvig količine cAMP in pospeši degradacijo glikogena. Obratno se je zgodilo v respiratorni fazi (Satroutdinov, 1992). Pri transformanti nPFK-M se je, glede na oceno specifične hitrosti rasti in produkcije zunajceličnih metabolitov pri različnih vsebnostih glukoze v gojišču (Preglednica 16 in 17), Crabtree efekt vklopil pri 5 % začetne koncentracije glukoze v gojišču. V tem gojišču smo izmerili večje vsebnosti etanola, hkrati pa smo opazili dobro rast transformante nPFK-M. Specifična hitrost rasti transformant je naraščala v gojiščih do 5 % glukoze, kjer je bila največja hitrost rasti. Pri transformanti kfPFK-M je na vseh gojiščih prisotna slaba rast. Prehodno produkcijo etanola takoj po prenosu v glukozno gojišče pa smo zasledili tudi pri nižjih koncentracijah glukoze v primerjavi s transformanto nPFK-M. Izgleda, da gre za močno ojačan Crabtree efekt, ki bi lahko povzročil metabolni stres in s tem dvig koncentracij znotrajceličnih metabolitov.

Pri naših poizkusih smo ugotovili, da glukoza ni nevarna za transformante z nativnim encimom PFK-M, ker obstaja inhibicija povratne zveze s citratom. Pri transformanti s kratkim fragmentom PFK-M pa zelo verjetno pride do metabolnega stresa in vklopa kontrolirane celične smrti (apoptoze). Apoptozo lahko po raziskavah Ludovico in sod. (2001) sproži 20-80 mM koncentracija acetata, ki so ga dodali v gojišče. Pri tretiranju celic s takšno koncentracijo acetata so se pojavili značilni znaki za apoptozo, kot so izpostavitve fosfatidil serina na zunanem delu plazmaleme in prelomi molekul DNA (Ludovico in sod., 2001).

Dejstvo, da se je acetat hitreje izločal iz celic pri transformanti kfPFK-M med rastjo v gojišču z visoko vsebnostjo glukoze, kaže na to, da so se celice poskušale rešiti metabolnega stresa z izločanjem enega od metabolitov. Na ta način skušajo uravnati zrušeno ravnotežje med katabolnimi in anabolnimi reakcijami v celici. Pri sintezi acetata z razliko od sinteze etanola prihaja do kopičenja NAD(P)H, ki se lahko delno reducira med sintezo biomase (NADPH) oziroma vstopi v respiratorno pot (NADH). Vendar pa je v primeru premočnega metabolnega pretoka preko glikolize prisoten Crabtree efekt, ki zavira respiratorno oksidacijo NADH, kar ima za posledico neuravnoteženje redoks razmerja v celici (Herwig in Stockar, 2002). Prekomeren metabolizem se pojavi pri količini piruvata, ko glikolitični pretok presega oksidativno sposobnost celic. V našem primeru je najbrž prišlo ravno do pojava, ko je bilo v celici zaradi privzema glukoze tudi preveč piruvata. Piruvat se pretvori v acetaldehid. Le-ta se z acetaldehid dehidrogenazo ob prisotnosti NADH pretvori do etanola ali ob prisotnosti NAD(P)⁺ do acetata. Če je v celici veliko acetaldehida, lahko tečeta obe poti hkrati. Torej se tvori tako etanol kot tudi acetat, pri slednjem pa nastaja NADH (Ferreira in sod., 2004). Ferreira in sod. (2004) so ugotovili, da kadarkoli je rekombinantna kvasovka *S. cerevisiae* (*MATa*, *cir*^o, *leu2-3*, 112, *his4-519*, *can1*) aktivirala biosintetske poti za sintezo encimov, potrebnih za vstop galaktoze, se je tvoril acetat, ki pa ni bil posledica prekomernega metabolizma.

Med uporabljenimi pogoji gojenja transformante kfPFK-M sicer nismo opazili bistveno povečane hitrosti rasti celic, kar je značilno za Warburgov efekt pri rakastih celicah. Vendar pa bi z nadaljnjimi raziskavami morda lahko prišli tudi do takšnega fiziološkega efekta pri kvasnih transformantah. Pri nekoliko nižjih začetnih koncentracijah glukoze (1 % in 2,5 %) so celice takoj po prenosu v glukozno gojišče rasle, vendar pa se je rast postopoma ustavljala predvsem zaradi odmiranja celic. Z uporabo gojišča s še nižjo začetno koncentracijo glukoze bi morda lahko zmanjšali hitrost vstopa glukoze v celice in omilili prekomeren nekontroliran metabolni pretok skozi glikolizo, ki pripelje do metabolnega stresa in odmiranja. Pod takšnimi pogoji bi tudi v kvasnih celicah, ki vsebujejo gen za visoko aktivni humani kratki fragment PFK-M, morda lahko inducirali metabolizem, podoben Warburgovemu efektu pri rakastih celicah.

5.2 SKLEPI

Preverili smo encimsko aktivnost encima PFK pri transformantah z nPFK-M in kfPFK-M in ugotovili, da je bil encim aktiven pri obeh. Prisotnost aktivatorja F26bP je povečala afiniteto obeh encimov do substrata, s tem da je bila razlika med dodatkom F26bP in brez aktivatorja pri kfPFK-M večja.

Testirali smo rast transformant na gojiščih z različnimi sladkorji in ugotovili, da je bila rast obeh transformant najboljša na maltozi, medtem ko transformanta kfPFK-M, najverjetneje zaradi metabolnega stresa, na glukozi ni rasla.

Za namnožitve celic v predstopnji rasti smo preizkusili dve gojišči. Za učinkovitejše se je izkazalo gojišče z dodanim 1 % maltoze. V tem gojišču so bile celice prilagojene s sintezo ustreznih encimov na izrabo glukoze po prenosu v glukozno gojišče. Prehod v glukozno gojišče je tako za celice predstavljal manjši stres, manjše pa je bilo tudi odmiranje celic.

Spremljali smo izločanje zunajceličnih metabolitov. Pri nPFK-M se je vklopil Crabtree efekt v gojišču s 5 % glukoze, kjer se je pojavil tudi porast v specifični produktivnosti etanola, hkrati pa je transformanta tudi uspešno rasla. Pri transformanti kfPFK-M je bila v gojiščih z različno koncentracijo glukoze rast slaba, vendar pa smo zasledili prehodno dobro specifično produktivnost etanola takoj po prenosu v glukozno gojišče tudi pri nižjih koncentracijah glukoze. Izgleda, da je šlo pri transformanti, ki sintetizira visoko aktiven kratki fragment PFK-M, za vklop močnega Crabtree efekta.

Odmiranje celic je povezano z metabolnim stresom in kopičenjem zunajceličnih metabolitov. Pri transformanti kfPFK-M se je v primerjavi s transformanto nPFK-M etanol izločal iz celic hitreje in predvsem pri nižjih začetnih koncentracijah glukoze v gojišču. Nasprotno pa se je acetat pri visokih začetnih vsebnostih glukoze v gojišču (5 % in 10 % glukoze) hitreje izločal iz celic pri transformanti kfPFK-M kot pri nPFK-M. Tako je prišlo do metabolnega stresa in vklopa apoptoze, ki naj bi jo, sodeč po dosedanjih raziskavah, sprožila prevelika koncentracija acetata.

Pri raziskanih pogojih gojenja transformante kfPFK-M sicer nismo dokazali efekta, podobnega Warburgovemu efektu, ki je značilen za rakaste celice. Nadaljnje raziskave pri kfPFK-M z gojenjem pri nižjih vsebnostih glukoze v gojišču pa bi morda lahko to potrdile.

6 POVZETEK

Rak je zelo razširjena bolezen moderne dobe in letno prizadene v Evropi približno 3,2 milijona ljudi. Ženske najpogosteje obolevajo za rakom dojke, moški pa za rakom prostate. Veča se tudi število rakastih obolenj pri otrocih. Ob večanju pojava rakastih obolenj pa se povečuje tudi stopnja preživetja zaradi uspešnih preventivnih testov in s tem zgodnjega odkrivanja bolezni. Rakaste celice uporabljajo različne mehanizme, ki jim omogočajo, da se obdržijo in nekontrolirano množijo ter razseljujejo po telesu. Za rakaste celice je med drugim značilna deregulacija energetskih procesov. Že pred več kot 80. leti je Otto Warburg opazil neobičajne lastnosti pri metabolizmu rakastih celic, ki v aerobnih pogojih vršijo aerobno glikolizo namesto oksidativne fosforilacije. Temu pojavu pravimo Warburgov efekt. Aerobna glikoliza je povezana z aktivacijo onkogenov (Ras) in mutiranih tumorskih zaviralcev (TP53). Onkogene mutacije omogočajo rakastim celicam privzem nutrientov, predvsem glukoze, ki presegajo energetske potrebe za rast in delitev. Spremenjen metabolizem v rakastih celicah omogoča hitro rast celic, ki je neodvisna od rastnih faktorjev.

Encim 6-fosfofrukto-1-kinaza je glavni regulatorni encim v glikolizi in fosforilira fruktozo-6-fosfat do fruktoze-1,6-bisfosfat. Gre namreč za kontrolo aktivnosti encima PFK1 z inhibicijo povratne zveze s citratom, aktivira pa ga fruktoza-2,6-bisfosfat. Posttranslacijska modifikacija encima PFK1, pri kateri nastane na inhibicijo s citratom neobčutljiv aktiven kratki fragment 47 kDa, naj bi bila ključni faktor deregulirane glikolize v tumorjih, ki v kombinaciji s spremenjenim mehanizmom signaliziranja omogoča hitro proliferacijo tumorskih celic.

Namen diplomske naloge je bil proučiti vpliv visokoaktivnega humanega kratkega fragmenta PFK-M (kfPFK-M) na metabolizem pri pivski kvasovki. Hkrati nas je zanimalo, ali izražanje gena, ki kodira visokoaktiven kfPFK-M, pri transformantah pivske kvasovke z izbitimi lastnimi geni za encime PFK, v celici inducira fiziološko stanje, podobno Warburgovemu efektu pri raku.

Rast transformant nPFK-M in kfPFK-M smo spremljali na različnih virih sladkorjev. Najboljša rast vseh transformant je bila v gojišču z dodanim 1 % maltoze, medtem ko na gojišču z dodanim 1 % glukoze transformanta kfPFK-M ni rasla. Maltoza najverjetneje ne predstavlja stresa za celice, kar pa ne velja za glukozo. Za nadaljnje analize smo uporabili transformante nPFK-M in kfPFK-M s plazmidom p416, pri kateri smo preverili tudi encimsko aktivnost encima PFK.

Glukoza je poleg saharoze preferenčni vir ogljikovih hidratov in deluje kot hitra prehrana za celice ter istočasno kot hormon, ki vklopi katabolno represijo in signalno pot Ras/cAMP/PKA. Prva pot zmanjša tvorbo biomase in sproži tvorbo etanola, kar lahko pomeni dodaten stres za celice, druga pot pa sproži mehanizme, ki privedejo do hitrejša rasti celic. Prevelika količina glukoze lahko negativno vpliva na metabolizem in sproži metabolni stres, ki v skrajnem primeru lahko sproži odmiranje celic.

Za namnožitve celic pred prenosom v gojišča z glukozo smo preizkusili dve gojišči, ki sta se razlikovali v vrsti ogljikovih hidratov. Preizkusili smo nefermentativna vira ogljikovih hidratov (glicerol in etanol) in fermentativni vir (maltozo). Ugotovili smo, da je stres pri prenosu celic iz gojišča z 1 % maltoze v gojišče z glukozo manjši, kot pri prenosu celic iz predstopnje rasti z glicerolom in etanolom. Celice so se najbrž poskušale rešiti metabolnega stresa z izločanjem enega od metabolitov. Zato smo spremljali rast in izločanje zunajceličnih metabolitov pri obeh transformantah v gojiščih z različno koncentracijo glukoze. Ugotovili smo, da je hitrost rasti transformante nPFK-M večja od hitrosti rasti transformante kfPFK-M. Crabtree efekt se je po rezultatih sodeč vklopil v celicah z nPFK-M v gojišču s 5 % glukoze. V celicah s kfPFK-M se je že pri nižjih koncentracijah glukoze v gojišču vklopil močno ojačan Crabtree efekt, saj smo izmerili velike koncentracije etanola v gojišču. Opazili smo značilna nihanja v specifični produktivnosti metabolitov, ki je splošno znan pojav pri kvasovkah in kjer se v posameznem ciklu izmenjujeta respiratorna in respiratorno-fermentativna faza. Opazili smo visoko specifično produktivnost etanola po 1. uri in med 4. in 5. uro po prenosu celic v gojišče z glukozo. Podobno je bilo z nihanjem specifične produktivnosti tudi pri acetatu. Acetat se je pri transformanti kfPFK-M izločal hitreje kot pri transformanti nPFK-M.

Povečane koncentracije acetata so lahko pri transformanti kfPFK-M povzročile metabolni stres in vklop apoptoze.

Pri raziskanih pogojih gojenja transformante kfPFK-M nismo opazili bistveno povečane hitrosti rasti celic, kar je značilno za Warburgov efekt pri rakastih celicah. Z nadaljnjimi raziskavami rasti transformante kfPFK-M, predvsem pri nižjih vsebnostih glukoze v gojišču, ki bi upočasnile hitrost vstopa glukoze v celice in tako omilile nekontroliran metabolni pretok skozi glikolizo, pa bi morda lahko prišli tudi do takšnih zaključkov.

7 VIRI

- Capuder M., Šolar T., Benčina M., Legiša M. 2009. Highly active, citrate inhibition resistant form of *Aspergillus niger* 6-phosphofructo-1-kinase encoded by a modified pfk-A gene. *Journal of biotechnology*, 144: 51-57
- De Deken R.H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology*, 44, 1: 149-156
- DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7: 11-20
- Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. 2011. The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et biophysica acta*, 1807: 568-576
- Dunaway G.A. 1983. A review of animal phosphofructokinase isoenzymes with an emphasis on their physiology role. *Molecular and cellular biochemistry*, 52: 75-91
- Ferreira B.S., Calado C.R.C., van Keulen F., Fonseca L.P., Cabral J.M.S, da Fonseca M.M.R. 2004. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways. *Journal of biotechnology*, 109: 159-167
- Gourlay C.W., Du W., Ayscough K.R. 2006. Apoptosis in yeast – mechanisms and benefits to a unicellular organism. *Molecular microbiology*, 62, 6: 1515-1521
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674

- Herwig C., van Stockar U. 2004. A small metabolic flux model to identify transient metabolic regulations in *Saccharomyces cerevisiae*. Bioprocess Biosyst Eng, 24: 195-403
- Holland M.J., Holland J.P. 1979. Isolation and characterization of a gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. The journal of biological chemistry, 254, 12: 5466-5474
- Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. Plos one, 6, 2: 1-10
- Kitagaki H., Araki Y., Funato K., Shimoi H. 2007. Ethanol-induced death in yeasts exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. Febs letters, 581: 2935-2942
- Lee J.Y., Burlet E., Gallano F., Circu M.L., Aw T.Y., Williams B.J., Witt S.N. 2011. Phosphate and succinate use different mechanisms to inhibit sugar – induced cell death in yeast. The journal of biological chemistry, 286, 23: 20267-20274
- Ludovico P., Sousa M.J., Silva M.T., Leão C., Côrte-Real M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. Microbiology, 147: 2409-2415
- Mlakar T., Legiša M. 2006. Citrate inhibition-resistant form of 9-phosphofructo-1-kinase from *Aspergillus niger*. Applied and environmental microbiology, 72, 7: 4515-4521
- Mumberg D., Müller R., Funk M. 1995. Yeasts vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene, 156, 1: 119-122
- Palermo V, Falcone C., Calvani M., Mazzoni C. 2010. Acetyl – L – carnitine protects yeast cells from apoptosis and aging and inhibits mitochondrial fission. Aging cell, 9: 570-579

- Piškur J., Rozpędowska E., Polakova S., Merico A., Compagno C. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in genetics*, 22, 4: 183-186
- Poorman R.A., Randolph A., Kemp R.G., Henrikson R.L. 1984. Evolution of phosphofructokinase – gene duplication and creation of new effector sites. *Nature*, 309: 467-469
- Pronk J.T., Steensma H.Y., Van Dijken J.P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12: 1607-1633
- Raben N., Exelbert R., Spiegel R., Sherman J.B., Nakajima H., Plotz P., Heinisch J. 1995. Functional expression of human mutant phosphofructokinase in yeast: genetic defects in French Canadian and Swiss patients with phosphofructokinase deficiency. *The American journal of human genetics*, 56: 131-141
- Satroudinov A.D., Kuriyama H., Kobayashi H. 1992. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS microbiology letters*, 98: 261-268
- Šmerc A., Sodja E., Legiša M. 2011. Posttranslational modification of 6-phosphofructo-1-kinase as an important feature of cancer metabolism. *Plos one*, 6, 5: 1-12
- Usenik A., Legiša M. 2010. Evolution of allosteric citrate binding sites on 6-phosphofructo-1-kinase. *Plos one*, 5, 11: 1-8
- Van Urk H., Mak P.R., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. 1988. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast*, 4: 283-291
- Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324: 1029-1033

Verstrepen K.J., Iserentant D., Malcorps P., Derdelinckx G., Van Dijk P., Winderickx J., Pretorius I.S., Thevelein J.M., Delvaux F.R. 2004. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeasts? Trends in biotechnology, 22, 10: 531-537

Vora S., Seaman C., Durham S., Piomelli S. 1980. Isozymes of human phosphofructokinase: identification and subunit structural characterization of a new system. Proceedings of the national academy of sciences, 77, 1: 62-66

Vora S., Wims L.A., Durham S., Morrison S.L. 1981. Production and characterization of monoclonal antibodies to the subunits of human phosphofructokinase: new tools for the immunochemical and genetic analyses of isozymes. Blood, 58, 4: 823-829

Xu Z., Tsurugi K. 2006. A potential mechanism of energy-metabolism oscillation in an aerobic chemostat culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The Febs journal, 273: 1696-1709

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. 2002. Biochemistry. 5. izdaja. New York, W.H. Freeman and Company: 1026 str.

Vector Database. 2011. Lab Life.
<https://www.lablife.org/> (27.dec.2011)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Maticu Legiši, za vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge, za nasvete in razlage, predvsem pa za dostopnost in vse popravke tekom pisanja in oblikovanja diplomske naloge.

Iskrena hvala tudi recenzentki, prof. dr. Blagajani Herzog-Velikonja, za kritičen pregled diplome, koristne popravke, nasvete in prijaznost. Najlepša hvala predsedniku komisije, prof. dr. Petru Mačku, za pregled, koristne popravke diplome in dostopnost.

Posebno se zahvaljujem mojim prijateljicam, predvsem Hani, za vse nasvete in pomoč ter spodbudne besede pri pisanju diplomske naloge. Hana, hvala tudi za čudovita študijska leta, ki sva jih preživeli skupaj, za vso pozitivno energijo in skupna kosilca, ko se nam ni dalo več.

Zelo velika hvala Janiju za koristno priganjanje, pomoč, spodbude in za vso potrpežljivost tekom študija, opravljanja praktičnega dela in sedaj na koncu.

Iz srca se zahvaljujem staršema, ki sta mi omogočila študij. Hvala vama za vso podporo, potrpežljivost in razumevanje.

Hvala tudi bratoma in ostalim domačim za razumevanje, še posebno v stresnih obdobjih študija.