

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Kristina ŠAVLI

**PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV
KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* PO
IZPOSTAVITVI Fe(III) in/ali Cr(III) IONOM V
ŠARŽNEM BIOPROCESU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Kristina ŠAVLI

**PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*
PO IZPOSTAVITVI Fe(III) in/ali Cr(III) IONOM V ŠARŽNEM BIOPROCESU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

COMPARISON OF PROTEINE PROFILES OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AFTER THE EXPOSURE TO Fe(III) and/or Cr(III) IONS IN BATCH BIOPROCESS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Katedri za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja dr. Polono Jamnik in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: dr. Polona Jamnik

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Kristina Šavli

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.22/.26 +547.96 : 582.282.23 : 546.72 :546.73 (043)=863
KG kvasovke/ *Saccharomyces cerevisiae*/Fe(III) ioni/Cr(III) ioni/toksičnost/
oksidativni stres/antioksidativni obrambni sistemi/proteomika/proteinski profili
AV ŠAVLI, Kristina
SA RASPOR, Peter (mentor)/JAMNIK, Polona (somentor)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2007
IN PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* PO IZPOSTAVITVI Fe(III) in/ali Cr(III) IONOM V ŠARŽNEM BIOPROCESU
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 54 str., 15 pregl., 15 sl., 7 pril., 82 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V nalogi smo skušali pojasniti vpliv dodatka 2,5 mM konc. Fe(III) ionov, 10 mM konc. Cr(III) ionov in sočasnega dodatka 2,5 mM konc. Fe(III) in 10 mM konc. Cr(III) v sredini eksponentne faze rasti na celico na ravni proteoma. Izvedli smo 2-D elektroforezo proteinov celičnega ekstrakta v območju molekulske mase 10 – 120 kDa in pI območju 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev smo primerjali s proteinskimi profili netretiranih vzorcev po 2 ali 4-h izpostavitvi z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Vpliv kovinskih ionov na celico smo spremljali tudi na fiziološkem nivoju, in sicer s spremljanjem rasti kvasovke z merjenjem OD₆₅₀. Ugotovili smo, da je dodatek Cr(III) ionov povzročil opazno manjšo inhibicijo hitrosti rasti kot pa dodatek Fe(III) ionov ali kombinacije obeh ionov. Manjša toksičnost Cr(III) ionov se je pokazala tudi v izražanju proteinov. Spremembe proteinskega profila pri izpostavitvi Cr(III) ionom so bile manj obsežne, vključevale so odsotnost le manjšega števila proteinov in represijo ter indukcijo sinteze le nekaterih proteinov, drugače pa je kazala razporeditev 2-D lis veliko podobnost s proteinskim profilom kontrole. Izpostavitve celic Fe(III) ionom in kombinaciji obeh ionov je povzročila podobno spremembo v proteinskem profilu, ta pa se je močno razlikoval od kontrole. Opazna je bila represija sinteze mnogih proteinov in odsotnost velikega števila proteinov, predvsem v območju molekulske mase 35 – 120 kDa in pI 4 - 7. 2-h izpostavitve celic Fe(III) ionov ali kombinaciji obeh ionov je povzročila tudi *de novo* sintezo 8 istih proteinov, katerih značilna je bila nizka molekulska masa (pod 25 kDa) in pI v območju 4 – 5. Za razliko od kombinacije ionov so posamezni Fe(III) ioni povzročili tudi indukcijo sinteze proteinov. Stresni odgovor kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III) ionov ali posameznim Fe(III) ionom se razlikuje od stresnega odgovora po izpostavitvi posameznim Cr(III) ionom, kar se odraža tako na fiziološkem nivoju kot na nivoju proteoma.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22/.26 +547.96 : 582.282.23 : 546.72 :546.73 (043)=863
CX yeasts/ *Saccharomyces cerevisiae*/Fe(III) ions/Cr(III) ions/toxicity /oksidative stress/antioksidative defence systems/proteomics/protein profiles
AU ŠAVLI, Kristina
AA RASPOR, Peter (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/CIGIČ, Blaž (reviewer)
PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI COMPARISON OF PROTEINE PROFILES OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AFTER THE EXPOSURE TO Fe(III) in/or Cr(III) IONS IN BATCH BIOPROCESS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 54 p., 15 tab., 15 fig., 7 ann., 82 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of the research was to study the effect of 2.5 mM concentration of Fe(III) and 10 mM concentration of Cr(III) ions on the yeast cell at proteome level. Fe(III) and Cr(III) ions were added separately and simultaneously in the mid-exponential growth phase. 2-D electrophoresis was used to analyse proteins of cell extracts in the molecular weight range 10 – 120 kDa and pI range 4 – 7. Protein profiles of treated and nontreated cells after 2- and 4-h exposure were compared using 2-Dymension software. The effect of metal ions on yeast cell was also monitored at physiological level by measuring OD₆₅₀. The results showed that addition of Fe(III) ions or combination of Fe(III) and Cr(III) ions caused higher inhibition compared to Cr(III) ions. Lower toxicity of Cr(III) ions was also observed from protein profile. Changes were less extensive including absence, upregulation and downregulation of only some proteins. In fact protein profile showed a great similarity to the control protein profile. On the contrary, exposure of cells to Fe(III) ions or combination of both ions caused similar changes in protein profile, that was different compared to control. We observed the absence and downregulation of a great number of proteins with molecular weight 35 – 120 kDa and pI 4 – 7. 2-h exposure of cells to Fe(III) ions or combination of both ions resulted in *de novo* synthesis of eight proteins with molecular weight below 25 kDa and pI range 4 – 5. Fe(III) ions caused upregulation of particular proteins, which was not observed at combination. The results showed that yeast stress response to Fe(III) ions or the combination of both ions is different than stress response in the case of Cr(III) ions, which was also observed on the physiological and proteome level.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ŽELEZO	2
2.1.1 Splošne lastnosti železa.....	2
2.1.2 Toksičnost železa	2
2.1.3 Vloga Fe(III) pri oksidativnem stresu	3
2.2 KROM	3
2.2.2 Toksičnost kroma	4
2.2.3 Vloga Cr (III) pri oksidativnem stresu	4
2.3 OKSIDATIVNI STRES	5
2.3.1 Definicija	5
2.3.2.1 Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot -}$)	5
2.3.2.2 Vodikov peroksid (H_2O_2)	6
2.3.2.3 Hidroksilni radikal (OH^{\cdot})	6
2.3.3 Posledice delovanja ROS v celici.....	6
2.3.4 Stresni odgovor	7
2.3.5 Antioksidativni obrambni sistemi.....	8
2.3.5.2 Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi	9
2.3.5.3 Stresni proteini.....	9
2.4 METODE ZA SPREMLJANJE OKSIDATIVNEGA STRESNEGA ODGOVORA CELICE KVASOVK.....	10
2.4.1 Metode za spremljanje stresnega odgovora na nivoju proteoma.....	11
2.5 DELOVNA HIPOTEZA	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 POTEK DELA.....	13
3.2 MATERIALI	14
3.2.2 Gojišča	14
3.2.2.1 YNB gojišče brez aminokislin (Yeast Nitrogen Base without amino acids)	14
3.2.3 Reagenti, raztopine.....	15
3.2.3.1 Priprava celičnega ekstrakta kvasovk.....	15
3.2.3.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu.....	15
3.2.3.3 Čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu	16
3.2.3.4 Dvodimenzionalna elektroforeza.....	16
3.2.3.5 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu	18
3.2.4 Oprema	19
3.3.1 Aerobna submerzna kultivacija kvasovke na stresalniku	20
3.3.2 Analiza proteinov celičnega ekstrakta.....	21
3.3.2.1 Priprava celičnega ekstrakta	21
3.3.2.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu.....	21

3.3.2.3 Čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu	22
3.3.2.4 Dvodimenzionalna elektroforeza	23
3.3.2.5 Dokumentiranje gelov in obdelava slik	25
3.3.3 Statistična obdelava podatkov	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 RASTNA KRIVULJA KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
4.2 VPLIV 2,5 mM KONCENTRACIJE Fe(III) IN 10 mM KONCENTRACIJE Cr(III) IONOV TER KOMBINACIJE OBEH KOVINSKIH IONOV NA RAST KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
4.3 VPLIV 2,5 mM KONCENTRACIJE Fe(III) IN 10 mM KONCENTRACIJE Cr(III) IONOV TER KOMBINACIJE OBEH KOVINSKIH IONOV NA PROTEINSKI PROFIL KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
4.3.1 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 2 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 h z 2,5 mM konc. Fe(III) ioni	30
4.3.2 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 2 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 h z 10 mM konc. Cr(III) ionov	32
4.3.3 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 2 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 h s kombinacijo obeh ionov	34
4.3.4 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 4 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 4 h z 2,5 mM konc. Fe(III) ioni	36
4.3.5 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 4 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 4 h z 10 mM konc. Cr(III) ioni	38
4.3.6 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 4 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 4 h s kombinacijo obeh ionov	40
5 SKLEPI	46
6 POVZETEK	47
7 VIRI	48
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Primarni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Jamieson, 1998; Jamnik in Raspor, 2005b; Moradas-Ferreira in sod., 1996; Sigler in sod., 1999; Walker, 1998).....	8
Preglednica 2:	Sestava YNB gojišča brez aminokislin (Yeast, 2000).....	14
Preglednica 3:	Sestava ekstrakcijskega pufra.....	15
Preglednica 4:	Priprava osnovne raztopine za rehidracijo trakov (2-D electrophoresis..., 1998).....	16
Preglednica 5:	Priprava pufra za uravnoteženje – osnovni (2-D electrophoresis..., 1998).....	16
Preglednica 6:	Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Protein electrophoresis..., 1994).....	17
Preglednica 7:	Sestava 5 x SDS elektroforeznega pufra (Protein electrophoresis..., 1994).....	18
Preglednica 8:	Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra (Protein electrophoresis..., 1994).....	18
Preglednica 9:	Barvanje proteinov s srebrom (Yan in sod., 2000).....	25
Preglednica 10:	Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2-h izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov.....	31
Preglednica 11:	Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2-h izpostavitvi 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov.....	33
Preglednica 12:	Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2-h sočasni izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom in 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov.....	35
Preglednica 13:	Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4-h izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov.....	37
Preglednica 14:	Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4-h izpostavitvi 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov.....	39
Preglednica 15:	Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4-h sočasni izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom in 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4 urni kultivaciji od sredine ekspo. faze, brez dodatka kovinskih ionov.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1:	Hodogram poskusa.....	13
Slika 2:	Določitev sredine eksponentne faze rasti kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> iz rastne krivulje, ki smo jo izrisali na osnovi dobljenih podatkov o optični gostoti vzorca in času kultivacije na stresalniku (T= 28 °C, 200 obr./min)	27
Slika 3:	Vpliv 2,5 mM konc. Fe(III) ionov, 10 mM konc. Cr(III) ionov in kombinacije 2,5 mM konc. Fe(III) ionov + 10 mM konc. Cr(III) ionov, ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze v gojišče YNB na rast kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri 24-urni aerobni kultivaciji na stresalniku (T= 28 °C, 200 obr./min). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh oz. štirih meritev v dveh neodvisnih gojitvah. Opombe črnega grafikona: kontrola -▲-, 2,5 mM Fe(III) + 10 mM Cr(III) -Δ-, 2,5 mM Fe(III) -■-, 10 mM Cr(III) -○-.....	28
Slika 4:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (A).....	30
Slika 5:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM konc. Fe(III) ionov (C), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.....	30
Slika 6:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze, brez prisotnosti kovinskih ionov (A).....	32
Slika 7:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 10 mM konc. Cr(III) (E), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.....	32
Slika 8:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (A).....	34
Slika 9:	2-D analiza proteinskega profila v ekstraktu celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM konc. Fe(III) in 10 mM konc. Cr(III) (G), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.....	34
Slika 10:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (B), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.....	36
Slika 11:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM konc. Fe(III)(D), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.	36
Slika 12:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (B).....	38
Slika 13:	2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke <i>Saccharomyces</i>	

	<i>cerevisiae</i> po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 10 mM konc. Cr(III)(F), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.	38
Slika 14:	2-D analiza proteinskega profila v ekstraktu celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 4 h kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti brez prisotnosti kovinskih ionov (B),.....	40
Slika 15:	2-D analiza proteinskega profila v ekstraktu celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 4 h kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM Fe(III) in 10 mM Cr(III) (H), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.....	40

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu; maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA
- Priloga B1: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 brez dodatka kovinskih ionov
- Priloga B2: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 z dodatkom 10 mM konc. Cr(III) ionov
- Priloga B3: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 z dodatkom 2,5 mM konc. Fe(III) ionov
- Priloga B4: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 z dodatkom 10 mM konc. Cr(III) ionov in 2,5 mM Fe(III) ionov
- Priloga C1: Rezultati prve neodvisne meritve absorbance pri 595 nm in določitev koncentracije proteinov (g/l) posameznih vzorcev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155.
- Priloga C2: Rezultati druge neodvisne meritve absorbance pri 595 nm in določitev koncentracije proteinov (g/l) posameznih vzorcev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₆₅₀	absorbanca ($\lambda = 650 \text{ nm}$)
APS	amonijev persulfat (angl. ammonium persulfate)
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumine)
CHAPS	(angl. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
Cr(III)	Cr ³⁺ , kromovi ioni ali spojine, v katerih je oksidacijsko št. 3
Da	dalton = $1,66 \times 10^{-24} \text{ g}$ (enota za M _r proteinov)
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol (angl. dithiothreitol)
Fe(III)	Fe ³⁺ , železovi ioni ali spojine, v katerih je oksidacijsko št. +3
GTF	glukozni tolerančni faktor
Hsp	proteini toplotnega šoka – stresni proteini (angl. heat shock proteins)
ICAT	(angl. isotope-coded affinity tagging)
IEF	izoelektrično fokusiranje (angl. isoelectric focusing)
konc.	koncentracija
KV (%)	koeficient variacije
m	masa
Mr	molekulska masa
MALDI-TOF MS	(angl. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)
min	minuta
mM	10^{-3} mol/l
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies)
SELDI-TOF	(angl. surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight)
SD	standardna deviacija
SDS	natrijev dodecil sulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	natrijev dodecil sulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
obr./min	obrati na minuto
TEMED	tetrametiletildiamin
v/v	ml/100 ml
w/v	g/100 ml
YNB	gojišče (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase)

ZIM
2-D elektroforeza

Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov
dvo-dimenzionalna elektroforeza

1 UVOD

Kvasovke se kot tudi drugi aerobni organizmi soočajo s toksičnimi učinki reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom (nepopolna redukcija kisika med respiracijo). V normalnih razmerah rasti so endogeni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo količino ROS na za celico neškodljivi ravni in popravijo celične poškodbe. Izpostavitve celic stresnemu dejavniku, ki je lahko ali visoka temperatura ali etanol, v našem primeru pa so to prehodne kovine (železo, krom), lahko povzroči nastanek večjih količin ROS. Takrat je preživetje celic odvisno od zaznavanja in prilagajanja na stresne razmere ter odstranjevanja ROS in popraviljanje morebitnih nastalih poškodb. Pri tem je pomembna indukcija primarnih in sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov – oksidativni stresni odgovor (Sanchez in sod. 1992). V primeru, ko se učinkovitost endogenih obrambnih sistemov preseže, nastopi oksidativni stres (Jamieson, 1998; Moradas-Ferreira in sod., 1996; Wheeler in sod., 1990).

Cr(III) ioni in Fe(III) ioni so v majhnih koncentracijah esencialni za celico (Kruszewski, 2003; Mutuma in sod., 1999). Višje koncentracije Fe(III) ionov so toksične in inducirajo tvorbo ROS, ki posledično vodijo do poškodb na celičnem in molekularnem nivoju (De Freitas in sod., 2003). Znano je, da tudi Cr(III) lahko povzroči tvorbo ROS (Ozawa in Hannaki, 1990). Reducirane oblike Fe(II) in Cr(II) lahko reagirajo z začetnimi slabo reaktivnimi intermedijati kisika (superoksidni anion, vodikov peroksid) in jih pretvorijo v visoko reaktivne oblike, katerih tarča je DNK, proteini in celična membrana, pri kateri pride do postopnega uničevanja strukture in funkcije (De Freitas in sod., 2003; Eide in sod., 1992; Ozawa in Hannaki, 1990).

V nalogi smo skušali pojasniti vpliv Fe(III) ionov, Cr(III) ionov in kombinacije obeh ionov na celico na ravni proteoma. Kot modelni organizem smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, katere metabolizem je zelo dobro preučen. Metabolizem kvasne celice je tudi na določenem nivoju primerljiv z metabolizmom in funkcijami višjih organizmov (Goffeau in sod., 1997). Izvedli smo 2-D elektroforezo proteinov celičnega ekstrakta v območju molekulske mase 10 – 120 kDa in pI območju 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev smo primerjali s proteinskimi profili netretiranih vzorcev po 2 ali 4-h izpostavitvi z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Vpliv kovinskih ionov na celico smo spremljali tudi na fiziološkem nivoju, in sicer s spremljanjem rasti kvasovke z merjenjem OD₆₅₀.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŽELEZO

2.1.1 Splošne lastnosti železa

Železo (Fe) je element VIII. skupine periodnega sistema. Nahaja se v več oksidacijskih stanjih (od $-II$ do $+VI$), pri čemer sta najstabilnejši stanji II in III (Greenwood in Earnshaw, 1998). Fe(II) in Fe(III) tvorita komplekse z različnimi ligandi. V odsotnosti ligandov se Fe(II) v aerobnih pogojih oksidira do Fe(III), ki v prisotnosti vode tvori okside in hidrokside z zelo nizko topnostjo (Chipperfield, 2003, Kosman, 2003).

Železo je esencialen element za vse evkarionte in večino prokariontov. Proteini in encimi, ki vsebujejo železo so namreč del pomembnih bioloških reakcij, kot so: transport in shranjevanje kisika, sinteza in popravljanje DNK, transport elektronov, odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti in številne druge (Kruszewski, 2003, Pierre in sod., 2002).

Prav zaradi pomembne vloge železa v organizmu obstajajo na trgu že nekaj časa železovi prehranski dodatki. Kot dodatki železa se uporabljajo naslednje spojine: železov (II) sulfat, železov (III) amonijev citrat, železov (II) fumarat, železov (II) sukcinat, železovi fosfati in elementarno železo v prahu (Hurrell, 2002; Lynch, 2002). Dodatki železa v prehrano zdravih oseb imajo lahko škodljive posledice zaradi nastanka prooksidativnih pogojev (Huang, 2003; Meneghini, 1997).

2.1.2 Toksičnost železa

Zaradi zmožnosti oddajanja in sprejemanja elektronov sodeluje železo v vrsti oksidoredukcijskih reakcijah. Zato je železo esencialno za organizem, vendar pa so višje koncentracije potencialno toksične, saj lahko »prosto« železo v celici v prisotnosti kisika tvori reaktivne kisikove zvrsti (ROS), katerih tarča je DNK, proteini in celična membrana, pri kateri pride do postopnega uničevanja strukture in funkcije (De Freitas in sod., 2003; Eide in sod., 1992). Organizmi morajo imeti zato dobro razvite mehanizme za nadzor homeostaze železa in presežka »prostega« železa, kar ponavadi zajema večstopenjski proces, sestavljen iz privzema, porabe in shranjevanja železa (Kruszewski, 2003).

2.1.3 Vloga Fe(III) pri oksidativnem stresu

Reducirana oblika Fe(II) v reakciji z H₂O₂ katalizira nastanek zelo reaktivnega hidroksilnega radikala (Fentonova reakcija) (1). Oksidirana oblika železa Fe(III) se s pomočjo superoksidnega radikala reducira nazaj v Fe(II) (Haber/Weissova reakcija) (2), ki se z vodikovim peroksidom spet oksidira.



Reakcija (3) lahko poteče tudi v odsotnosti kovinskih ionov, vendar železovi ioni povečajo hitrost te reakcije (De Freitas in Meneghini, 2001; Santoro in Thiele, 1997).

2.2 KROM

2.2.1 Splošne lastnosti kroma

Krom (Cr) je splošno razširjen mineralni element. Najdemo ga v kamninah, prsti, rastlinah, živalih ter v vulkanskem prahu in plinih. Lahko obstaja v različnih oksidacijskih stanjih, od -2 do +6, med katerimi sta najbolj stabilni obliki šestvalentni Cr(VI) in trivalentni Cr(III), ki imata dokaj različne kemijske lastnosti (Barceloux, 1999; Losi in sod., 1994).

Tako Cr(VI) kot Cr(III) imata široko industrijsko uporabo, in sicer v proizvodnji barvil in pigmentov, v proizvodnji jekla in zlitin, strojenju usnja, galvaniziranju, pri izdelavi zaščitnih premazov za zaščito lesa (Losi in sod., 1994; Toxicological review of hexavalent chromium, 1998; Toxicological review of trivalent chromium, 1998).

Cr(III) v sledovih velja za esencialni element v prehrani človeka in živali (Mutuma in sod., 1999). Biološka aktivna oblika kroma se imenuje glukozni tolerančni faktor (GTF). Gre za kompleks med Cr, nikotinsko kislino in nekaterimi aminokislinami, vendar še danes ni popolnoma okarakteriziran (Davis in sod., 1996; Stearns, 2000). GTF stimulira delovanje insulina in na ta način vpliva na metabolizem glukoze, lipidov in proteinov (Bagchi in sod., 2002; Lamson in Plaza, 2002). Danes so na voljo razna Cr(III)-prehranska dopolnila, ki so lahko v različnih oblikah (Cr(III)-klorid, Cr(III)-pikolinat, Cr(III)-nikotinat ali s Cr(III) obogatena kvasna biomasa), bodisi kot samostojni dodatki, še pogosteje pa v kombinaciji z drugimi minerali in vitamini (Barceloux, 1999; Chromium report, 2004).

2.2.2 Toksičnost kroma

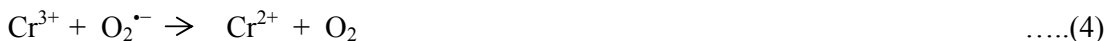
Za razliko od Cr(VI), ki deluje genotoksično in mutageno, Cr(III) v večini raziskav ni pokazal teh učinkov (Cervantes in sod., 2001). Razliko med obema skupinama spojin pripisujejo različnemu prehodu v celice, saj so celične membrane kar 1000-krat bolj prepustne za Cr(VI) kot za Cr(III) (Bagchi in sod., 2002; Klein in sod., 1998). Cr(III) običajno tvori heksakoordinatne komplekse, ki zaradi svoje geometrije in pozitivnega naboja slabo prehajajo skozi celične membrane (Raspor in sod., 1999; Sugden in sod., 1992). Vstop Cr(III) je možen le s pasivnim transportom oziroma fagocitozo. Membranski proteini za aktiven transport Cr(III) v celico niso znani (Blasiak in Kowalik, 2000).

Prav zaradi svoje heksakoordinatne narave, Cr(III) lahko reagira s številnimi celičnimi makromolekulami in tako vpliva na njihovo delovanje (Kareus in sod., 2001). Cr(III) lahko poškoduje dvojno vijačnico, tako da se direktno veže na DNK, ali pa indirektno, prek ROS, ki nastajajo ob metabolizmu Cr v celicah. Vezava lahko poteka preko fosfatnega ogrodja ali preko baz v DNK (O'Brien in sod., 2003). Vezava na fosfatno ogrodje dvojne vijačnice je pomembna za nastanek enostavnih Cr - DNK povezav, DNK - DNK povezav (O'Brien in sod., 2002) in kompleksov med DNK, Cr in aminokislinami oz. proteini (Voitkun in sod., 1998; Zhitkovich in sod., 1995, 2001). Biološke posledice vezave Cr(III) na DNK so raznolike in so za celico lahko usodne, saj vplivajo na najbolj osnovne procese v celici, kot sta npr. podvajanje DNK in izražanje genov (Snow, 1991; Snow, 1994; Sugden in sod., 1992).

Toksičnost Cr(III) se izraža tudi tako, da lahko vpliva na delovanje proteinov, bodisi neposredno z vezavo nanje ali pa posredno, prek ROS, ki nastanejo pri metabolizmu Cr v celici. Cr(III) se lahko veže na aktivno mesto proteina in tako neposredno vpliva na njegovo delovanje, lahko pa se veže na neko drugo mesto v proteinu in pri tem spremeni njegovo konformacijo ter s tem dostopnost katalitičnega mesta za substrat (Bal in sod., 1997, 1997a in 2000).

2.2.3 Vloga Cr (III) pri oksidativnem stresu

Za Cr(III) je veljalo, da je netoksična, stabilna oblika Cr in da se v celici ne more več naprej reducirati. Raziskave pa so pokazale, da je tudi Cr(III) aktivna biološka in oksidacijska oblika kroma, ki je vključena v redoks kroženje, pri čemer nastajajo ROS (Stohs in Bagchi, 1995). Cr(III) se namreč s pomočjo bioloških reducentov L-cisteina in NADH lahko reducira do Cr(II) (4), le-ta pa naprej reagira s H₂O₂ in tvori hidroksilni radikal (5), ki ima genotoksičen učinek (Ozawa in Hannaki, 1990; Spetijeens in sod., 1999):



2.3 OKSIDATIVNI STRES

2.3.1 Definicija

Stres pomeni vsak odmik od optimalnih pogojev celice (Ruis, 1997). Pri mikroorganizmih lahko stres definiramo kot nekaj, kar ima negativen vpliv na rast oziroma zmanjša hitrost rasti celic (Piper, 1997).

Oksidativni stres je po definiciji porušenje ravnotežja med tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov celice (Halliwell in Gutteridge, 2000). Je posledica izpostavljenosti celice ROS, ki povzročajo poškodbe na proteinih, nukleinskih kislinah in celičnih membranah (Stohs in Bagchi, 1995).

Odgovor celice na oksidativni stres je odvisen od obsega oksidativnega stresa. Ob manjših koncentracijah ROS se celice nanje prilagodijo in postanejo bolj odporne na oksidativni stres, večje koncentracije ROS pa povzročijo zamik celične delitve in indukcijo antioksidativnih obrambnih in popravljalnih sistemov. Zelo visoke koncentracije ROS, ki jih celice ne zmorejo odstraniti oz. popraviti povzročenih poškodb, pa vodijo v programirano celično smrt (apoptoza) (Jamieson, 1998; Temple in sod., 2005).

2.3.2 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Med reaktivne kisikove zvrsti (ROS) uvrščamo kisikove proste radikale in kisikove reaktivne spojine. Kisikovi prosti radikali so zelo reaktivni in nastajajo pri različnih procesih v organizmu, predvsem pri redoks encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektrona. Kisikovi prosti radikali so atomi, ioni, molekule ali deli molekul, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron, ki je po večini primerov tudi vzrok za njihovo kemično reaktivnost. Kisikove reaktivne spojine so spojine, ki nastajajo v različnih celičnih procesih in lahko pod določenimi pogoji tvorijo proste radikale. Najpogostejše oblike ROS v organizmu so superoksidni radikal, vodikov peroksid in hidroksilni radikal. Slednji je zaradi svoje velike kemične reaktivnosti tudi najnevarnejši (Halliwell in Gutteridge, 2000; March, 1992).

2.3.2.1 Superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$)

$O_2^{\bullet -}$ je šibka baza z majhno reaktivnostjo za večino biomolekul. Nastaja iz kisika pri celičnem dihanju in pri interakcijah s celičnimi reducenti (glutation, NADH) (Santoro in Thiele, 1997). Prisotnost naboja omejuje njegovo prehajanje skozi biološke membrane, zato je omejen na lokaciji, kjer nastane (Nordberg in Arner, 2001). Kljub njegovi majhni reaktivnosti je za celico zelo pomembna njegova hitra odstranitev, saj v nasprotnem primeru lahko povzroči nastanek visoko reaktivnih ROS. Superoksidni radikal je zato le posredni vzrok številnih biokemičnih poškodb celic in tkiv (Sigler in sod., 1999).

2.3.2.2 Vodikov peroksid (H_2O_2)

H_2O_2 je naravno prisoten v večini celic, saj nastaja pri oksidativnem elektronskem transportu v mitohondrijih. Nastane tudi z delovanjem encima superoksid dismutaza, ki katalizira pretvorbo superoksidnega radikala v kisik in vodikov peroksid. Vodikov peroksid ni radikal (Aruoma, 1998). Po velikosti je molekula, podobna vodni molekuli. Ta lastnost in njegova nevtralnost mu omogočata učinkovito prehajanje bioloških membran in lahko difundira po vsej celici (Manček in Pečar, 2001; Nordberg in Arner, 2001; Shackelford in sod., 1999). Vodikov peroksid ob srečanju s kovinskimi ioni prehodnih elementov, razpade na izredno reaktivni hidroksilni radikal (Manček in Pečar, 2001).

2.3.2.3 Hidroksilni radikal (OH^{\bullet})

OH^{\bullet} zaradi svoje visoke reaktivnosti neselektivno reagira z okolico oz. skoraj z vsako celično sestavino (sladkorji, aminokislinae, fosfolipidi, nukleotidi, organskimi kislinae) (Aruoma, 1998). Reakcije OH^{\bullet} potekajo na tri načine in sicer a.) z odvzemom vodika (H^{\bullet}) b.) z adicijo na dvojno vez c.) s prenosom elektrona. Hidroksilni radikal nastane iz vodikovega peroksida v t.i. Fentonovi reakciji, pri kateri je nujna prisotnost prehodnih kovinskih ionov, predvsem železa (Halliwell in Gutteridge, 2000; Manček in Pečar, 2001).

2.3.3 Posledice delovanja ROS v celici

Kot je bilo že omenjeno, ROS, predvsem hidroksilni radikal, v celici reagirajo z DNK, proteini, lipidi (Sigler in sod., 1999).

Lipidna peroksidacija je serija radikalskih in oksidativnih sprememb polinenasičenih maščobnih kislin, ki na koncu privedejo do razpada membranske strukture in spremembe njene funkcije. Končni produkti lipidne peroksidacije so različni aldehidi, ketoni, epoksidi, nižje maščobne kisline in različni krajši ogljikovodiki. Aldehidi, epoksidi in alkani so sposobni poškodovati DNK in inaktivirati proteine (Halliwell in Gutteridge, 2000; Manček in Pečar, 2001; Sigler in sod., 1999; Štalcer in Ploj, 1993).

Posledice oksidativnih poškodb DNK se kažejo v fragmentaciji DNK, intrakromosomskih rekombinacijah, poškodbah sladkorjev, odcepitve ali spremembe nukleinskih baz. Oksidirane so lahko vse baze v DNK, najpogosteje pa je oksidiran gvanin. Oksidativne poškodbe DNK, ki vodijo v mutacije, se ponavadi izrazijo takoj, ko se DNK podvoji (Costa in Moradas-Ferreira, 2001; Halliwell in Gutteridge, 2000; Toledano in sod., 2003).

Oksidativne poškodbe proteinov vključujejo oksidacijo aminokislin (Cys, His, Arg, Lys in Pro), fragmentacijo proteinov, nastanek navskrižnih povezav znotraj proteinov in med različnimi molekulami proteinov ter DNK (Kasprzak, 2002; Levine in sod., 1994). Posledice oksidacije so spremenjeni in manj aktivni encimi, pa tudi denaturirani, popolnoma nefunkcionalni proteini (Sheehan, 2006).

2.3.4 Stresni odgovor

Po izpostavitvi celic stresnemu dejavniku, ki je lahko ali visoka temperatura ali etanol, v našem primeru pa so to prehodne kovine, ki negativno vplivajo na rast oziroma zmanjšujejo hitrost rasti celic, se inducirajo molekularni mehanizmi, ki jih splošno označujemo kot stresni odgovor (Sanchez in sod., 1992). Njihova naloga je zaščititi celice pred potencialno škodljivimi učinki stresnih dejavnikov in popraviti poškodbe molekul ter ustvariti tolerantno stanje, ki pomaga ščititi pred nadaljnimi poškodbami (Mager in Hohmann, 1997).

Stresni odgovori, ki omogočajo prilagoditev celice na stresni dejavnik, so lahko t.i. zgodnji in pozni odgovori. Zgodnji odgovori, ki nudijo takojšno zaščito pred subletalnimi stresnimi pogoji, se kažejo v spremembi aktivnosti že obstoječih encimov s post-translacijskimi modifikacijami kot tudi že aktivaciji signalnih poti, ki inicirajo pozne odgovore. Pozni odgovori, ki nudijo bolj učinkovito zaščito proti močnemu stresu, vključujejo *de novo* sintezo stresnih proteinov, indukcijo antioksidativnih obrambnih sistemov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.3.5 Antioksidativni obrambni sistemi

Da bi kvasovke preprečile oksidativni stres v celici in z njim povezane poškodbe celice, so razvile antioksidativne obrambne sisteme. Razdelimo jih na primarne in sekundarne antioksidativne obrambne sisteme (Costa in Moradas-Ferreira, 2001; Jamieson, 1998).

2.3.5.1 Primarni antioksidativni obrambni sistemi

Primarni antioksidativni obrambni sistemi imajo nalogo, da odstranjujejo ali sodelujejo pri odstranjevanju ROS. Vključeni so tako encimski kot ne-encimski obrambni sistemi (Jamieson, 1998), pregled le-teh pa je predstavljen v Preglednici 1.

Preglednica 1: Primarni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Jamieson, 1998; Jamnik in Raspor, 2005b; Moradas-Ferreira in sod., 1996; Sigler in sod., 1999; Walker, 1998)

obrambni sistemi	funkcija
encimski	
katalaza A	razgradnja vodikovega peroksida v peroksisomu
katalaza T	razgradnja vodikovega peroksida v citoplazmi
Cu/Zn superoksid dismutaza	razgradnja superoksidnega aniona v citoplazmi
Mn superoksid dismutaza	razgradnja superoksidnega aniona v mitohondriju
glutation reduktaza	redukcija oksidirane glutationa
tioredoksin reduktaza	redukcija oksidirane tioredoksina
glutation peroksidaza	redukcija vodikovega peroksida in lipidnih hidroperoksidov v reakciji z glutatomom
tioredoksin peroksidaza	razgradnja alkilnih hidroperoksidov
citokrom C peroksidaza	redukcija vodikovega peroksida
glukoza-6-fosfat dehidrogenaza	redukcija NADP ⁺ v NADPH
ne-encimski	
glutation	lovilec prostih radikalov, redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
metalotionini	vezava Cu, lovilec superoksidnih in hidroksilnih radikalov
poliamini	zaščita lipidov pred oksidacijo
tioreksin	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
glutaredoksin	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
fitokelatini	lovilec prostih radikalov, redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
lipofilni antioksidanti	lovilec prostih radikalov

2.3.5.2 Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi

Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi prevzamejo vlogo, ko raven oksidantov naraste do te mere, da primarni antioksidativni obrambni sistemi niso več zadostni in nastopijo poškodbe. Vključujejo sisteme za popravljanje ali odstranjevanje produktov oksidativnih poškodb DNK, lipidov in proteinov (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Sem štejemo popravljalne sisteme DNK, kot sta encim 8-okso-gvanin-glikozilaza/liaza, ki izrezuje oksidirane DNK baze in encim AP-endonukleaza, ki izrezuje apurinska in apirimidinska (AP) mesta in tvori 3-hidroksilne skupine na AP mestih (Moradas-Ferreira in Costa, 2000).

Pomembni so tudi lipolitični encimi in proteolitični sistemi. Proteolitični sistemi sodelujejo pri razgradnji in odstranjevanju oksidativno poškodovanih proteinov. Proteoliza je povečana ob blagem oksidativnem stresu, ker povzroči modifikacije celičnih proteinov, ki so dovzetni za proteolizo. Nasprotno, močan oksidativni stres povzroči nastanek močno poškodovanih proteinov, ki so odporni na proteolizo, zato je proteoliza zmanjšana (Davies, 2001).

2.3.5.3 Stresni proteini

Za vse organizme, ki so izpostavljeni stresnim dejavnikom, je značilen skupen molekularni odgovor, ki povzroči izrazito spremembo v izražanju genov, kar ima za posledico povečano sintezo družine proteinov, ki jih imenujemo proteini toplotnega šoka ali stresni proteini (heat shock proteins – Hsp) (Fent, 1998).

Stresni proteini sodelujejo pri razgradnji poškodovanih proteinov, pri renaturaciji denaturiranih proteinov in omogočijo ponovno zvitje proteinov v nativno konformacijo (Whitley in sod., 1999). Posebno vlogo ima Hsp 104, ki sodi med visoko ohranjeno družino stresnih proteinov Hsp 100. Do indukcije njegove sinteze pride v različnih stresnih pogojih, tudi v primeru oksidativnega stresa (Jamnik in Raspor, 2005a). Hsp 104 omogoča disociacijo in reaktivacijo proteinskih agregatov, ki nastanejo, ko se proteini denaturirajo in se pri tem odvijajo in nato tvorijo agregate (Parsell in sod., 1994).

2.4 METODE ZA SPREMLJANJE OKSIDATIVNEGA STRESNEGA ODGOVORA CELICE KVASOVK

V uporabi so različne metode za spremljanje oksidativnega stresnega odgovora kvasovk (Jamnik in Raspor, 2003).

- Spremljanje parcialnega tlaka kisika med kultivacijo
- Določanje živosti celic
- Z uporabo različnih spektrofotometričnih in elektroforetskih metod merjenje aktivnosti spodaj naštetih encimov, ki so del primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov:
 - katalaze
 - superoksid dismutaze
 - glutation peroksidaze
 - glutation reduktaze
 - glukoza-6-fosfat dehidrogenaze
 - tioredoksin reduktaze
 - citokrom C peroksidaze
- Z uporabo različnih spektrofotometričnih in kromatografskih metod merjenje vsebnosti neencimskih primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov, kot so:
 - glutation
 - tioredoksin
 - metalotionini
- Spremljanje stresnega odgovora na nivoju transkriptoma, z različnimi metodami analize mRNA, kot so:
 - analiza mRNA z metodo Northern
 - dopolnjena metoda Northern z dodatkom encima RNAze
 - *in situ* hibridizacija
 - RT-PCR
 - real-time PCR
 - DD PCR
 - serijska analiza genske ekspresije (SAGE)
 - DNA mikromreže
- Spremljanje stresnega odgovora na nivoju proteoma.

2.4.1 Metode za spremljanje stresnega odgovora na nivoju proteoma

Proteomika je veda, ki proučuje proteine. Daje informacijo tako o izražanju proteinov kot tudi njihovih posttranslacijskih modifikacijah, katerih poznavanje je še posebej pomembno za boljši vpogled razumevanja biosinteznih procesov v celici (Jamnik, 2007).

Metoda analize proteoma, ki je definiran kot nabor vseh proteinov v celici, vključuje dva koraka: (1) ločevanje proteinov in (2) identifikacijo proteinov (Lubec in sod., 2003).

Za ločevanje proteinov je na voljo več metod, kot so dvodimenzionalna elektroforeza (2D GE), diferencialna 2D GE (2D DIGE), ICAT, SELDI-TOF in proteinske mreže. Za spremljanje stresnega odgovora v celici se uporablja predvsem 2D GE, t.j. metoda, ki vključuje ločevanje proteinov v dveh dimenzijah (Görg, 1992; O'Farrell, 1975).

V prvi dimenziji 2D GE poteka izoelektrično fokusiranje, kjer se proteini ločujejo glede na izoelektrične točke (Righetti in sod., 1990). Drugo dimenzijo predstavlja natrijev dodecil sulfat gelska elektroforeza (SDS PAGE), ki loči proteine na podlagi njihove molekulske mase (Laemmli, 1970). Kombinacija obeh dimenzij ima za posledico visoko ločljivost proteinov. Istočasno lahko ločimo več kot tisoč proteinov in pridobimo informacijo o izoelektrični točki proteina in njegovi molekularni masi (Nelson in Cox, 2005). Čeprav ima metoda nekaj pomanjkljivosti, kot so slaba zmožnost ločevanja proteinov z visoko molekularno maso (nad 200 kDa), hidrofobnih proteinov in tistih, ki so prisotni v nizkih koncentracijah v celici, predstavlja uporaba trakov z imobiliziranim pH gradientom v 1. dimenziji osnovo za ponovljivost ločevanja proteinov glede na njihove izoelektrične točke (Chen in sod., 2003).

Metoda je primerna za ločevanje kompleksne mešanice proteinov, pridobljenih iz celic, tkiv ali drugih bioloških vzorcev. Rezultat dvodimenzionalne elektroforeze celičnega ekstrakta je gel z množico lis imenovan tudi proteinski profil celice. Lise na gelu predstavljajo posamezne proteine in zajemajo skoraj vse proteine proteoma. Nekateri proteini so izraženi v koncentracijah, ki so pod mejo detekcije metode barvanja s srebrom in zato na gelu niso vidni (Yan in sod., 2000). Razlike v izražanju in sintezi proteinov v različnih celicah ali celicah iste vrste, ki so bile drugače tretirane, se kažejo v spremembi proteinskega profila.

Za identifikacijo proteinov se največkrat uporablja masna spektrometrija (MS) (npr. MALDI TOF MS) (Lahm in Langen, 2000) ali tandemsko masna spektrometrija (MS/MS) (Fountoulakis in sod., 1998). Ostale metode identifikacije vključujejo še določanje aminokislinskega zaporedja, N-terminalno sekvenciranje, različne imunološke in kromatografske metode (Fountoulakis, 2001).

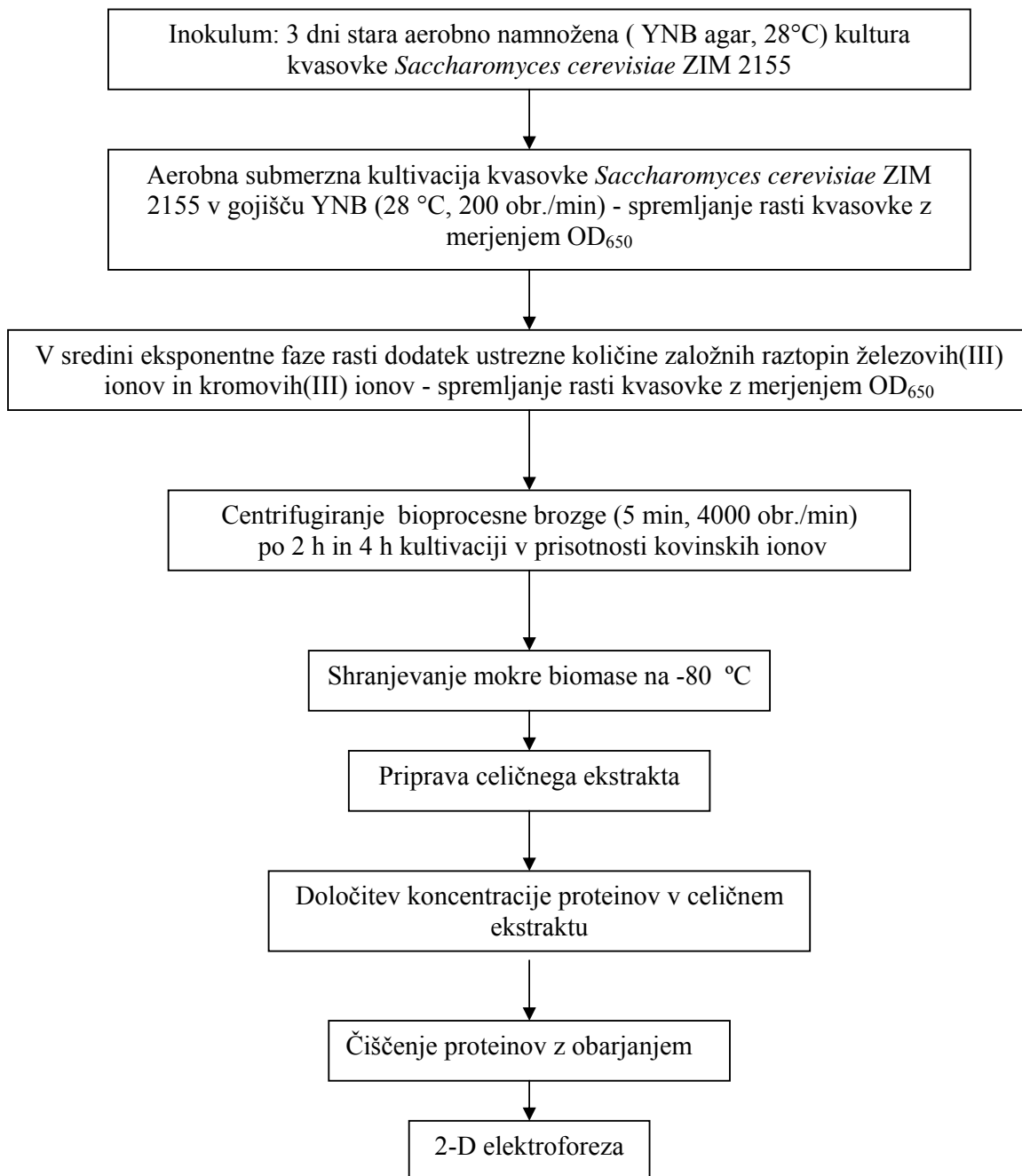
2.5 DELOVNA HIPOTEZA

Trdimo:

- da se stresni odgovor kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III) ionov razlikuje od stresnega odgovora po izpostavitvi posameznim Fe(III) in Cr(III) ionom, kar se odraža v spremenjenem proteinskem profilu.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 1: Hodogram poskusa

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizem

Uporabili smo sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* - ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Po revitalizaciji smo vitalnost kvasovke ohranjali z rednim precepljanjem na petrijeve plošče s trdnim YNB gojiščem vsake tri dni in kulturo inkubirali pri temperaturi 28 °C.

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 YNB gojišče brez aminokislin (Yeast Nitrogen Base without amino acids)

YNB gojišče vsebuje vse vrste vitaminov in anorganskih soli v sledovih v koncentraciji manjši od 1 mg/l, ne vsebuje aminokislin.

Preglednica 2: Sestava YNB gojišča brez aminokislin (Yeast, 2000)

Sestavina	Proizvajalec	Koncentracija v gojišču (g/l)
(Na ₄) ₂ SO ₄ (p.a)	Sigma	5,000
KH ₄ PO ₄ (p.a)	Sigma	1,000
MgSO ₄ (p.a)	Sigma	0,500
NaCl (p.a)	Sigma	0,100
CaCl ₂ (p.a)	Sigma	0,100
Inositol	Sigma	0,002
Bakteriološki agar*	Biolife	20,00

Legenda: * dodatek samo pri trdnem YNB gojišču

6,7 g YNB gojišča smo raztopili v 100 ml destilirane vode in ga po filtraciji skozi filter s porami velikosti 0,2 µm dodali sterilizirani raztopini glukoze s koncentracijo 10 g/l.

Tekoče YNB gojišče

Tekoče YNB gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase. Po pripravi raztopine glukoze s koncentracijo 10 g/l smo le-to sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar. YNB gojišče smo pripravili v enotni raztopini, ki smo jo aseptično filtrirali s pomočjo sterilne filtrne naprave skozi membranski filter (Sartorius, velikost por 0,2 µm). Prefiltrirano YNB gojišče smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C in ga nato dodali na sobno temperaturo ohlajeni in sterilni raztopini glukoze.

Trdno YNB gojišče

Trdno gojišče YNB smo uporabili za ohranjanje vitalnosti kvasovk. Sestava trdnega gojišča YNB se razlikuje od sestave tekočega gojišča YNB le v dodatku bakteriološkega agarja. Raztopini glukoze s koncentracijo 10 g/l smo dodali 20 g/l bakteriološkega agarja in po zaklejitvi v mikrovalovni pečici gojišče prav tako sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo gojišču s temperaturo okrog 50 °C dodali sterilno YNB gojišče, premešali in ga razlili v petrijevke.

3.2.3 Reagenti, raztopine

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili številne spodaj naštetе reagentе in raztopine.

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (p.a., min. 93,0 %, Merck) za pripravo založne raztopine Fe(III) ionov s koncentracijo 1 M Fe(III)
- $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (p.a., min. 93,0 %, Merck) za pripravo založne raztopine Cr(III) ionov s koncentracijo 0,5 M Cr(III)
- Fiziološka raztopina - 0,9 % raztopina NaCl (p.a., Merck)

3.2.3.1 Priprava celičnega ekstrakta kvasovk

- Ekstrakcijski pufar

Preglednica 3: Sestava ekstrakcijskega pufra

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
1 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,0	4 ml	40 mM
CHAPS (Fluka)	2 g	2 % (w/v)
DTT (Sigma)	1 g	65 mM
Dodamo ddH ₂ O do 100 ml		

- 1 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,0
Tris-baza (Sigma) 24,2 g
dodamo 150 ml ddH₂O
uravnavamo pH na 8,0 s konc. HCl
dodamo ddH₂O do 200 ml

Na 10 ml ekstrakcijskega pufra dodamo 1 tabletko inhibitorjev proteaz – Complete Mini (Roche).

3.2.3.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

- NaCl (p.a., Merck) za pripravo 0,15 M vodne raztopine
- Bradfordov reagent (BioRad)
- Goveji serumski albumin (BSA) (100%, Sigma)

3.2.3.3 Čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu

- 2-D Clean-Up Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

3.2.3.4 Dvodimenzionalna elektroforeza

1. dimenzija

- rehidracija trakov

Preglednica 4: Priprava osnovne raztopine za rehidracijo trakov (2-D electrophoresis... , 1998)

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
tiourea (Sigma)	1,52 g	2 M
urea (Sigma)	4,2 g	7 M
CHAPS (Fluka)	0,2 g	2 % (w/v)
IPG pufer (Fluka)	200 µl	2 % (v/v)
bromfenol modro (Sigma)	0,0005 g	0,002 % (w/v)
DTT (Sigma)	0,028 g	0,022 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 10 ml		

- mineralno olje (Sigma)

2. dimenzija

- pufer za uravnoteženje trakov – osnovni

Preglednica 5: Priprava pufra za uravnoteženje - osnovni (2-D electrophoresis... , 1998)

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH= 8,8	5 ml	50 mM
urea (Sigma)	36 g	6 M
glicerol (Sigma)	30 ml	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
bromfenol modro (Sigma)	0,002 g	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 ml		

- pufer za uravnoteženje trakov I (2-D electrophoresis...., 1998)
 - DTT (Sigma) 0,2 g
 - dodamo pufer za uravnoteženje - osnovni do 20 ml
- pufer za uravnoteženje trakov II (2-D electrophoresis...., 1998)
 - jodacetamid (Sigma) 0,96 g
 - dodamo pufer za uravnoteženje - osnovni do 20 ml

Pufer za uravnoteženje I in II pripravimo sveže.

- priprava ločilnega gela

Preglednica 6: Priprava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida (Protein electrophoresis. ., 1994)

Sestava	Količina
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30%/0,8 %)	13,5 ml
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH 8,8	9,8 ml
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 ml
ddH ₂ O	13 ml
10 % (w/v) raztopina APS	195 µl
TEMED (Sigma)	13 µl

Raztopino APS in TEMED smo dodali k raztopini (akrilamid/bisakrilamid + raztopina Tris-HCl + raztopina SDS + ddH₂O), ki smo jo predhodno razplinili v ultrazvočni kopeli (15 minut).

Količine ustrezajo za pripravo dveh gelov.

- raztopine za pripravo ločilnega gela

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

Tris-baza (Sigma) 36,3 g
dodamo 150 ml ddH₂O
uravnamo pH na 8,8 s konc. HCl
dodamo ddH₂O do 200 ml

10 % (w/v) raztopina SDS

SDS (Sigma) 10,0 g
dodamo ddH₂O do 1000 ml

10 % (w/v) raztopina APS

APS (Sigma) 0,1 g
dodamo ddH₂O do 1 ml

- priprava agaroznega gela

Agarozna raztopina (2-D electrophoresis..., 1998)

agaroz (Sigma) 0,5 g

dodamo 1 x SDS elektroforezni pufer do 100 ml

Raztopino segrejemo v mikrovalovni pečici, da se agaroz raztopi in dodamo 1 kristalček barvila bromfenol modro.

- priprava SDS elektroforeznega pufera

Preglednica 7: Sestava 5 x SDS elektroforeznega pufera (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	Količina	končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	15,0 g	260 mM
Glicin (Merck)	72,0 g	960 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,5 % (w/v)
dodamo dd H ₂ O do 1000 ml		

Preglednica 8: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufera (Protein electrophoresis..., 1994)

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
Glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo dd H ₂ O do 1000 ml		

3.2.3.5 Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

- Barvanje proteinov s srebrom

95 % raztopina etanola

100 % etanol (Merck) 190 ml

dodamo 10 ml ddH₂O

20 % (w/v) AgNO₃

AgNO₃ (Sigma) 20 g

dodamo 100 ml ddH₂O

10 % (w/v) raztopina Na₂SO₃ x 5H₂O

Na₂SO₃ x 5H₂O (Merck) 15,7 g

dodamo 100 mlH₂O

Ledocetna kislina (Merck)

Na-acetat (Kemika)

EDTA (Kemika)

Na₂CO₃ (Merck)

37 % formaldehid (Merck)

3.2.4 Oprema

- Steklovina in potrošni material:
 - 1,5 ml Eppendorf centrifugirke,
 - 2 ml plastične epruvete (Eppendorf),
 - 150 ml, 500ml in 1000 ml erlenmajerice s stransko roko,
 - centrifugirke,
 - infuzijske steklenice,
 - merilne bučke,
 - merilni valji,
 - petrijeve plošče,
 - cirkonij/kremenčeve kroglice (BioSpec Products, Inc.),
 - sterilni membranski filtri (premer por 0,2 µm) (Sartorius),
 - bakteriološke epruvete,
 - plastične kivete (Sarstedt),
 - male steklene epruvete

- Aparature:
 - avtoklav (Sutjeska),
 - avtomatske pipete (Gilson),
 - brezprašna komora (Iskra P10 SMBC 122),
 - centrifuge (Tehtnica LC-32, Sigma 3K30, Eppendorf 5415C),
 - digestorij,
 - hladilnik (LHT Škofja Loka),
 - inkubator (JOUAN IG150),
 - magnetno mešalo (Tehtnica Železniki 550),
 - mikrovalovna pečica (Sanyo),
 - pH meter (Mettler Toledo SevenMulti),
 - rotacijski stresalnik (Tehtnica Železniki),
 - spektrofotometer (Iskra MA 9520) za merjenje optične gostote,
 - spektrofotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000),
 - sušilnik (Sutjeska),
 - tehtnica (Sartorius analytic),
 - tehtnica (Sartorius excellence),
 - vrtničnik (Tehtnica Železniki EV 100),
 - zamrzovalna skrinja (- 20°C) (LTH Škofja Loka),
 - zamrzovalnik (- 80 °C) (Heto).

- Oprema za 2-D elektroforezo:

1. dimenzija

- komercialni trakovi z imobiliziranim pH gradientom (13-cm, pH gradient: 4 - 7) (Amersham Pharmacia Biotech),
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo stripov (Amersham Pharmacia Biotech),
- Multiphor II elektroforetska enota (Amersham Pharmacia Biotech),
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (Amersham Pharmacia Biotech),
- plastična posoda z vdolbinami (Amersham Pharmacia Biotech),
- elektrodni trakovi (Amersham Pharmacia Biotech),
- elektrodi (Amersham Pharmacia Biotech),
- usmernik EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biotech),
- MultiTemp III termostatski cirkulator (Amersham Pharmacia Biotech).

2. dimenzija

- vertikalni diskontinuuirni elektroforetski sistem SE 600 1-Loeffer Scientific Instruments,
- 1-mm distančniki,
- steklene plošče,
- zgornja in spodnja posoda z elektrodama,
- hladilni sistem v obliki pretočnih cevi,
- usmernik Multi Drive XL (Pharmacia LKB),
- ultrazvočna kopel (Sonis Pio).

- Programska oprema:

- sistem za dokumentacijo 2-D gelov HP scanjet 5590
- računalniški program za obdelavo gelov 2-D Dymension (Syngene).

3.3 METODE

3.3.1 Aerobna submerzna kultivacija kvasovke na stresalniku

Uporabili smo standardiziran inokulum kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, to je 3 dni staro kvasno biomaso s plošč YNB, ki smo jo s cepilno zanko prenesli v sterilno 1000 ml erlenmajerico s tekočim gojiščem YNB, do začetne OD = 0,2 ($\lambda = 650$ nm).

Aerobne submerzne kultivacije na stresalniku so potekale pri temperaturi 28 °C in 200 obr./min. Rast kvasne biomase smo spremljali z merjenjem optične gostote vsake dve uri prvih 12 ur in nato še s končno meritvijo po 24 urah. Za umerjanje spektrofotometra smo uporabili slepi vzorec, to je gojišče pred inokulacijo. Na osnovi dobljenih podatkov o optični gostoti kvasne brozge in času kultivacije smo narisali rastno krivuljo (odvisnost optične gostote od časa kultivacije). Na osnovi rastne krivulje smo določili čas, pri katerem se kvasovka nahaja v sredini eksponentne faze rasti. V našem primeru je bilo to takrat, ko je optična gostota kvasne brozge dosegla vrednost 0,75.

Do sredine eksponentne faze rasti smo aerobne submerzne kulture izvajali v 1000 ml erlenmajerici s stransko roko s štirimi utori, nakar smo 300 ml kvasne brozge z merilnim valjem porazdelili v 150 ml erlenmajerice s stransko roko s štirimi utori, v vsako po 50 ml. Dodali smo ustrezne količine založnih raztopin Fe(III) in Cr(III) ionov. Kot kontrolni vzorec nam je služila 150 ml erlenmajerica z inokuliranim gojiščem in brez dodatka založnih raztopin kovinskih ionov.

Po 2 h in 4 h kulture od sredine eksponentne faze rasti smo kvasno brozgo prelili v plastične centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 4000 obr./min. Supernatant smo odlili, celice resuspendirali v 5 ml fiziološke raztopine (0,9 % (w/v) raztopina NaCl) in ponovno centrifugirali 5 minut pri 4000 obr./min. Supernatant smo previdno odlili in mokro biomaso shranili pri temperaturi -80 °C.

3.3.2 Analiza proteinov celičnega ekstrakta

3.3.2.1 Priprava celičnega ekstrakta

Pred uporabo smo vzorce odtajali na sobni temperaturi. Uporabili smo metodo razbijanja celic s cirkonij/kremenčevimi kroglicami (Scopes, 1987). K biomasi v mikrocentrifugirkah, smo dodali ohlajen ekstrakcijski pufer (preglednica 2) in cirkonij/kremenčeve kroglice v razmerju 1:5:5. Sledilo je razbijanje celic 4 x po 1 minuto na vrtničniku z vmesnimi 1-minutnimi intervali na ledu. Tako pridobljeni homogenat smo centrifugirali 20 minut pri 20000 g in $T = 4\text{ °C}$. V supernatantih smo določili koncentracijo proteinov in jih nato zamrznili pri temp. - 80 °C.

3.3.2.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

Za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu smo uporabili metodo po Bradfordu (1976).

Metoda temelji na dejstvu, da se barvilo Coomassie brilliant modro G-250 veže na proteine. Pri tem se rdeča barva barvila spremeni v modro, s tem pa se spremeni absorpcijski maksimum barvila iz 465 nm na 595 nm. Vezava barvila na proteine poteče hitro (približno 2 minuti) in kompleks protein - barvilo ostane stabilen približno eno uro.

Celični ekstrakt (50 μ l) smo odpipetirali v male steklene epruvete in dodali 2,5 ml razredčenega Bradfordovega reagenta (BR) (1 del BR, 4 deli destilirane vode), premešali in po 5 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Pri slepem vzorcu smo namesto celičnega ekstrakta uporabili 50 μ l ekstrakcijskega pufra.

Iz umeritvene krivulje (priloga A) smo izračunali maso proteinov v 50 μ l celičnega ekstrakta na podlagi enačbe:

$$A_{595} = 0,00926 \times \text{masa proteinov} + 0,072$$

Za umeritveno krivuljo smo uporabili znane koncentracije govejega serumskega albumina (BSA) razredčenega v 0,15 M raztopini NaCl.

3.3.2.3 Čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu

Za čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu smo uporabili 2-D Clean-Up Kit (Stasyk in sod., 2001). Postopek čiščenja temelji na obarjanju proteinov in odstranjevanju motečih snovi, kot so detergenti, soli, lipidi, fenoli in nukleinske kisline. Očiščene proteine po čiščenju raztopimo v določeni raztopini, npr. raztopina za rehidracijo trakov.

Čiščenje proteinov je potekalo po navodilih proizvajalca in je bilo sledeče:

- prenos 150 μ l vzorca ekstrakta, ki vsebuje 100 μ g proteinov, v mikrocentrifugirko
- dodatek 3-kratnega volumna precipitanta (glede na volumen vzorca), mešanje na vrtinčniku in inkubacija na ledu 15 minut
- dodatek 3-kratnega volumna ko-precipitanta (glede na volumen vzorca) mešanici vzorca in precipitanta, kratko mešanje na vrtinčniku
- centrifugiranje pri 8000 g 10 minut
- odstranitev supernatanta s previdnim pipetiranjem, sediment se ne sme resuspendirati
- dodatek 80 μ l ko-precipitanta (takšen volumen, da se prekrije sediment) in inkubacija na ledu 5 min
- centrifugiranje pri 8000 g 5 minut, odstranitev supernatanta
- dodatek 50 μ l ddH₂O (takšen volumen, da se prekrije sediment), mešanje na vrtinčniku, da se sediment resuspendira
- dodatek 1 ml pufra za izpiranje (hlajen pri temperaturi - 20 °C vsaj 1 uro) in 5 μ l aditiva, mešanje na vrtinčniku (sediment se ne raztopi, ampak resuspendira)
- inkubacija pri T = - 20 °C 30 minut, mešanje na vrtinčniku 20-30 sekund vsakih 10 minut
- centrifugiranje pri vsaj 8000 g 10 minut
- odstranitev supernatanta (viden mora biti bel sediment), sušenje sedimenta na zraku največ 5 minut
- raztopitev sedimenta v raztopini za rehidracijo trakov (preglednica 3) mešanje na vrtinčniku do popolnega raztapljanja sedimenta
- centrifugiranje pri 8000 g 10 minut pri 15-20 °C, nanos supernatanta na trakove z imobiliziranim pH gradientom za 1. dimenzijo 2-D elektroforeze ali prenos na - 80 °C do nanosa na gel

3.3.2.4 Dvodimenzionalna elektroforeza

2-D elektroforeza vključuje ločevanje proteinov v dveh dimenzijah. V prvi dimenziji poteka izoelektrično fokusiranje, kjer se proteini ločujejo na osnovi izoelektrične točke, v drugi dimenziji pa se ločujejo po velikosti glede na molekulsko maso (SDS-PAGE) (Nelson in Cox, 2000).

Kombinacija dveh dimenzij omogoča visoko ločljivost proteinov in analizo razlik v sintezi proteinov v proteomskih študijah, spremljanje globalne sinteze in preverjanje čistosti proteinov med izolacijo.

2-D elektroforezo smo izvedli na osnovi metode, ki jo je postavil O'Farrel (1975) z modifikacijo 1. dimenzije, ki jo je uvedel Görg (1991). Modifikacija vključuje uporabo komercialnih trakov z imobiliziranim pH gradientom.

1. dimenzija

1. dimenzija obsega več korakov:

- rehidracija trakov in nanos vzorcev
- izoelektrično fokusiranje

Rehidracija trakov in nanos vzorcev

Uporabili smo 13 cm dolge trakove z imobiliziranim pH gradientom (4 - 7), ki smo jih hranili na temperaturi - 20 °C. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek smo uravnali v ravnotežno pozicijo in nato odpipetirali 250 µl raztopine za rehidracijo trakov (preglednica 3), ki je že vsebovala vzorec ($m_{\text{proteinov}} = 100 \mu\text{g}$). S traku smo z anodnega konca (+) odstranili zaščitno plastično folijo, ki prekriva gel in ga previdno, brez tvorbe mehurčkov, položili z gelom navzdol v režo ter prelili z 2,5 ml mineralnega olja. Podstavek smo nato prekrili z pokrovom in pustili 13 ur, da je potekala rehidracija.

Izoelektrično fokusiranje

Po končani rehidraciji smo trakove narahlo sprali z bidestilirano vodo in jih z gelom navzgor osušili na filter papirju. Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med potekom izoelektričnega fokusiranja, smo nanесли 3 - 4 ml mineralnega olja in čezenj postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, tako da je bil anodni priključek nameščen na vrhu plošče. V podstavek smo dali plastično ploščo z vdolbinami, pred tem smo v podstavek nalili 10 ml mineralnega olja. V vdolbine plastične plošče smo položili trakove z gelom navzgor in pozitivnim koncem na zgornjem delu plošče. Nato smo dva enako dolga elektrodna trakova namočili v bidestilirani vodi, ju malo osušili na filter papirju, položili pravokotno na oba konca trakov in čez njiju namestili elektrodi. Trakove smo nato prelili s približno 230 ml mineralnega olja.

Pogoji izoelektričnega fokusiranja ("gradient" način) so bili sledeči:

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

Izoelektrično fokusiranje je potekalo pri temperaturi 20 °C.

Po končanem IEF smo trakove shranili v plastični mapi pri temperaturi - 80 °C do izvedbe 2. dimenzije.

2. dimenzija

2. dimenzija obsega več faz:

- vlitje gelov
- uravnoteženje trakov
- prenos trakov na ločilni gel
- SDS-PAGE

Vlivanje gelov

Med stekleni plošči, ki skupaj z ostalimi sestavnimi deli oblikujeta kalup, smo najprej vlili ločilni gel (19 ml za en gel) z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida (preglednica 5). Na zgornjo površino gela smo z mikropipeto nanесли tanko plast bidestilirane vode, ki gelu preprečuje stik z kisikom, kar omogoča enakomerno polimerizacijo. Ko je gel polimeriziral, smo vodo odlili in površino gela dobro osušili.

Uravnoteženje trakov

Trakove smo vzeli iz zmrzovalnika, jih prenesli v epruvete z 10 ml pufr za uravnoteženje I in jih dali na stresalnik za 15 minut. Iz pufr za uravnoteženje I smo trakove prenesli v epruvete z 10 ml pufr za uravnoteženje II in jih dali na stresalnik še za 15 minut. Trakove smo pred prenosom na ločilni gel osušili na filter papirju.

Prenos trakov na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo nalili agarozno raztopino, ki je bila segreta na temperaturo 80 °C in takoj previdno, brez tvorbe mehurčkov, spustili skozi trak, ki se je usedel na površino gela.

SDS-PAGE

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup namestili med dve posodi, kjer se nahajata elektrodi. Obe posodi smo napolnili z 1 x SDS elektroforeznim pufrom (preglednica 7). Potovanje vzorcev je potekalo s sprotnim hlajenjem v smeri anode najprej 15 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel in nato pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler barvilo bromfenol modro, ni doseglo spodnjega roba gela.

Detekcija proteinov na poliakrilamidnem gelu

Po končani elektroforezi smo gele barvali s srebrom. Barvanje s srebrom spada med najbolj občutljive ne-radioaktivne metode za detekcijo proteinov in temelji na vezavi srebrovih ionov na sulfhidrilne in karboksilne skupine proteinov in naknadni redukciji do kovinskega srebra. Meja detekcije je 2-5 ng beljakovine (Yan in sod., 2000). Gele smo barvali takoj po končani elektroforezi.

Preglednica 9: Barvanje proteinov s srebrom (Yan in sod., 2000). Količine so navedene za barvanje dveh gelov.

	korak	Raztopina	čas
1	fiksacija	200 ml 95 % etanola (v/v) raztopine etanola + 50 ml ledocetne kisline + ddH ₂ O do 500 ml	30 min
2	predtretiranje	34 g Na-acetata + 10 ml 10 % (w/v) raztopine Na ₂ SO ₃ x 5 H ₂ O + 150 ml 95 % (v/v) etanola + ddH ₂ O do 500 ml	30 min
3	izpiranje	500 ml ddH ₂ O	3 x 5 min
4	barvanje	6,25 ml 20 % (w/v) AgNO ₃ + ddH ₂ O do 500 ml	20 min
5	izpiranje	500 ml ddH ₂ O	2 x 1 min
6	razvijanje	12,5 g NaCO ₃ + 200 µl 37 % formaldehida + ddH ₂ O do 500 ml	2 min 18 s
7	ustavitev reakcije	7,3 g EDTA + ddH ₂ O do 500 ml	10 min
8	izpiranje	500 ml ddH ₂ O	3 x 5 min

3.3.2.5 Dokumentiranje gelov in obdelava slik

Gele smo dokumentirali z uporabo sistema za dokumentacijo gelov HP scanjet 5590. Slike smo obdelali z računalniškim programom 2-D Dymension (Syngene). Primerjali smo intenzitete 2-D elektroforetskih lis. Te primerjave smo podali z kvocientom R, ki smo ga definirali kot razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega in tretiranega vzorca, izražene glede na kontrolo. Za izražene 2-D lise smo upoštevali le tiste, kjer je bilo razmerje ≥ 2 .

3.3.3 Statistična obdelava podatkov

Aerobne submerzne kulture na stresniku, določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu smo izvajali v več ponovitvah. Rezultati meritev so podani kot povprečna vrednost (Adamič, 1989).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

n.....št. meritev;

X_i.....vrednost i-te meritve

Za oceno variabilnosti rezultatov pri paralelnih vzorcih smo uporabili standardni odklon (SD) in koeficient variabilnosti (KV) (Adamič, 1989).

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

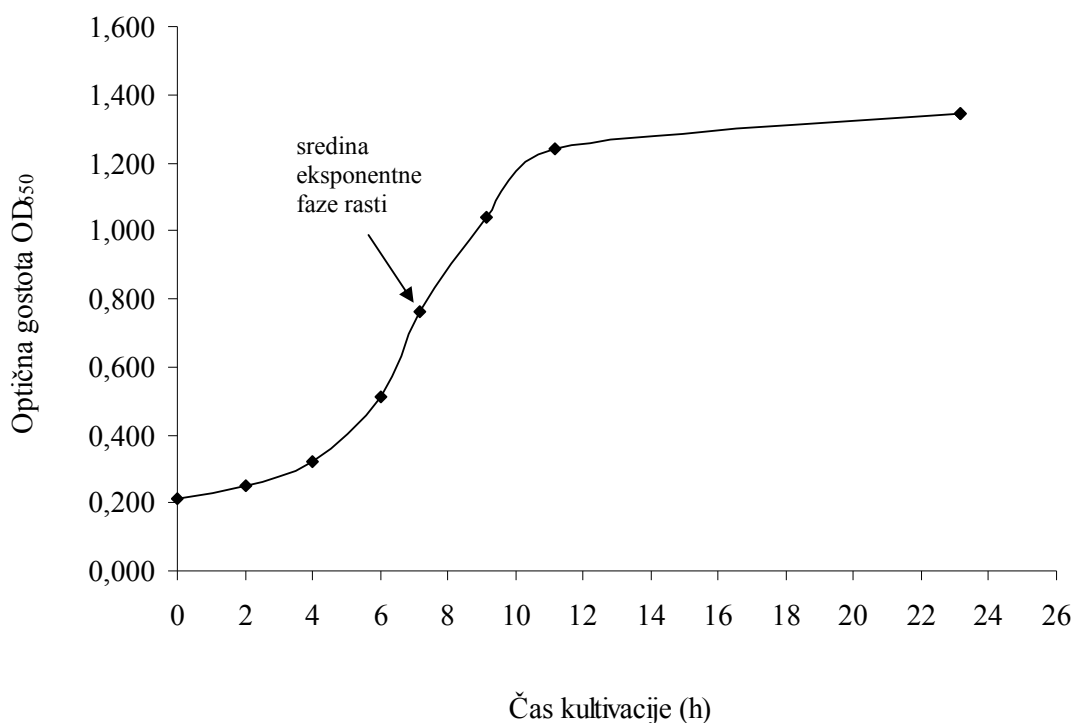
$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V času od aprila do oktobra 2006 smo opravili 510 ur laboratorijskega dela in izvedli poskuse v skladu z delovno hipotezo, da se stresni odgovor kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III) ionov razlikuje od odgovora po izpostavitvi posameznim Fe(III) in Cr(III) ionom, kar se odraža v spremenjenem proteinskem profilu.

4.1 RASTNA KRIVULJA KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

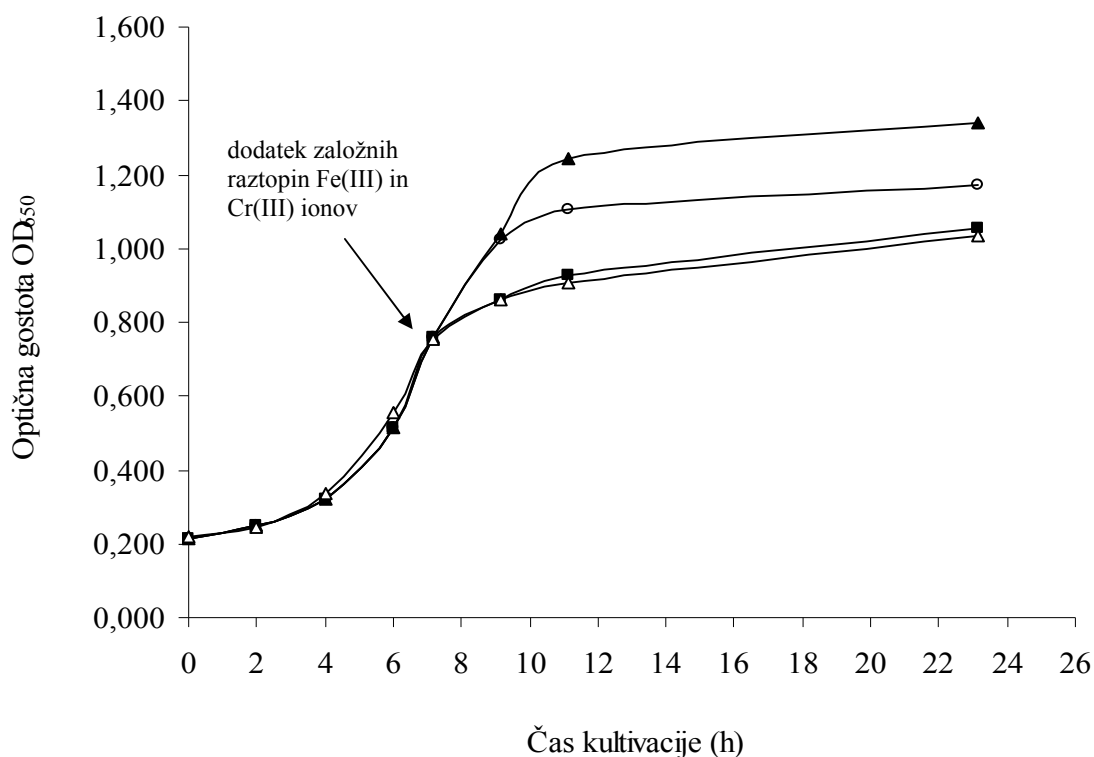
Slika 2 prikazuje rastno krivuljo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* kultivirane brez prisotnosti kovinskih ionov. Za nadaljnje poskuse smo morali namreč določiti sredino eksponentne faze rasti, ki jo je kvasovka, v našem primeru, dosegla pri $OD_{650} = 0,75$.



Slika 2: Določitev sredine eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* iz rastne krivulje, izrisane na osnovi dobljenih podatkov o optični gostoti vzorca in času kultivacije na stresalniku ($T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min). Rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev v dveh neodvisnih gojitvah.

4.2 VPLIV 2,5 mM KONCENTRACIJE Fe(III) IN 10 mM KONCENTRACIJE Cr(III) IONOV TER KOMBINACIJE OBEH KOVINSKIH IONOV NA RAST KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

Spremljali smo optično gostoto kontrolnega vzorca, in ko je le-ta dosegel vrednost 0,75, smo na osnovi predhodnih kultur domnevali, da je kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* v sredini eksponentne faze rasti. Takrat smo v gojišče dodali 2,5 mM konc. Fe(III) ionov, 10 mM konc. Cr(III) ionov oziroma kombinacijo Fe(III) in Cr(III) ionov. Slika 3 prikazuje vpliv dodatka kombinacije Fe(III) in Cr(III) ionov in vpliv dodatka posameznih Fe(III) in Cr(III) ionov. Za boljšo primerjavo je na grafu podan tudi kontrolni vzorec, ki ne vsebuje ionov kovin.

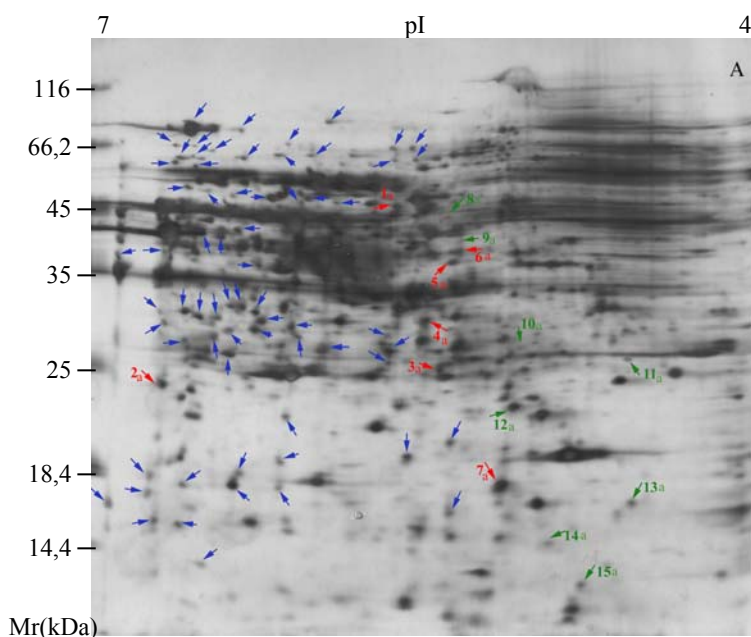


Slika 3: Vpliv 2,5 mM konc. Fe(III) ionov, 10 mM Cr(III) ionov in kombinacije 2,5 mM konc. Fe(III) ionov + 10 mM konc. Cr(III) ionov, ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze v gojišče YNB na rast kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* pri 24-urni aerobni kultivaciji na stresalniku ($T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh meritev v dveh neodvisnih gojitvah. Opombe črnega grafikona: kontrola -▲-, 2,5 mM Fe(III) + 10 mM Cr(III) -△-, 2,5 mM Fe(III) -■-, 10 mM Cr(III) -○-.

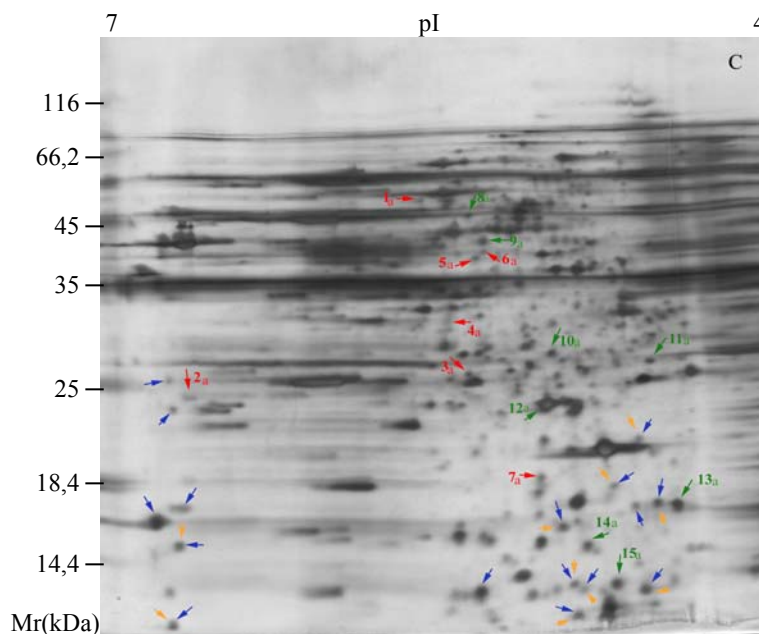
4.3 VPLIV 2,5 mM KONCENTRACIJE Fe(III) IN 10 mM KONCENTRACIJE Cr(III) IONOV TER KOMBINACIJE OBEH KOVINSKIH IONOV NA PROTEINSKI PROFIL KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

Po dodatku 2,5 mM konc. Fe(III) ali 10 mM konc. Cr(III) ionov ter kombinacije obeh kovinskih ionov v sredini eksponentne faze rasti, smo po 2 in 4-h kultivaciji v prisotnosti kovinskih ionov, brozgo odcentrifugirali in mokro biomaso shranili na -80°C . Pripravili smo celični ekstrakt, določili koncentracijo proteinov, očistili proteine z obarjanjem in jih analizirali z 2-D elektroforezo. Rezultat analize so posamezni proteinski profili celičnih ekstraktov kontrole po 2h in po 4 h kultivacije od eksponentne faze rasti in celic tretiranih 2 h in 4 h z 2,5 mM koncentracijo Fe(III) ionov ali 10 mM koncentracijo Cr(III) ionov ali kombinacijo obeh kovinskih ionov. 2-D elektroforezo posameznih vzorcev smo naredili v dveh ponovitvah in za nadaljno primerjavo izbrali tisti gel, na katerem so bile proteinske lise bolj razvidne. Z računalniškim programom za obdelavo gelov 2-D Dymension (Syngene) smo naredili primerjave določenih proteinskih profilov celičnih ekstraktov, ki so predstavljene v nadaljevanju.

4.3.1 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 2 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 h z 2,5 mM konc. Fe(III) ioni



Slika 4: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (A).



Slika 5: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM konc. Fe(III) ionov (C), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.

Obrazložitev pomena izbranih barvnih puščic, ki označujejo posamezne 2-D lise na gelih:

modra – lisa je prisotna samo na enem gelu

rdeča – represija sinteze (down regulacija)

zelena – indukcija sinteze (up regulacija)

rumena – lisa, ki se pojavlja na proteinskih profilih C, D, G, H

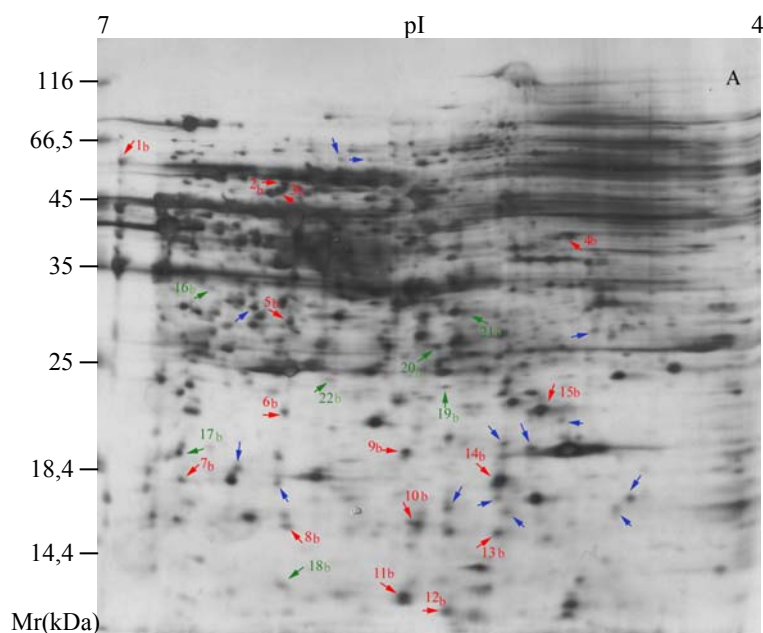
Preglednica 10: Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2-h izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov. Lise, ki so označene z rdečimi številkami, so na profilu A bolj izražene. Lise, ki so označene z zelenimi številkami, so bolj izražene na profilu C.

številka lise	kvocient R ^a	številka lise	kvocient R ^a
represija sinteze		indukcija sinteze	
1a	- 3,1	8a	+ 2,4
2a	- 2,9	9a	+ 3,9
3a	- 2,3	10a	+ 3,7
4a	- 3,5	11a	+ 3,3
5a	- 2,7	12a	+ 2,3
6a	- 3,9	13a	+ 2,7
7a	- 7,2	14a	+ 2,6
		15a	+ 2,4

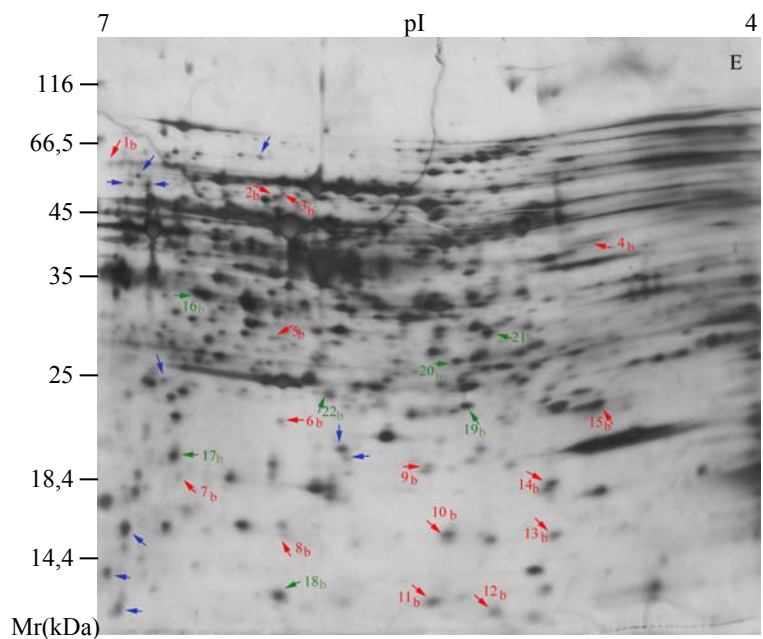
^a = razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega vzorca in vzorca tretiranega 2 h z 2,5 mM konc. Fe(III), izraženo glede na kontrolo

Iz primerjave proteinskih profilov A in C ugotavljamo, da ima 2-h izpostavitve celic 2,5 mM Fe(III) ionom negativen vpliv na izražanje proteinov, saj povzroči odsotnost velikega števila proteinov, predvsem v območju pI 6 – 7. Opazna je tudi *de novo* sinteza 16 proteinov, katerih skupna značilnost je nizka molekulska masa (pod 25 kDa).

4.3.2 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 2 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 h z 10 mM konc. Cr(III) ionov



Slika 6: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (A).



Slika 7: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 10 mM konc. Cr(III) (E), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.

Obrazložitev pomena izbranih barvnih puščic, ki označujejo posamezne 2-D na gelih:

modra – lisa je prisotna samo na enem gelu

rdeča – represija sinteze (down regulacija)

zelena – indukcija sinteze (up regulacija)

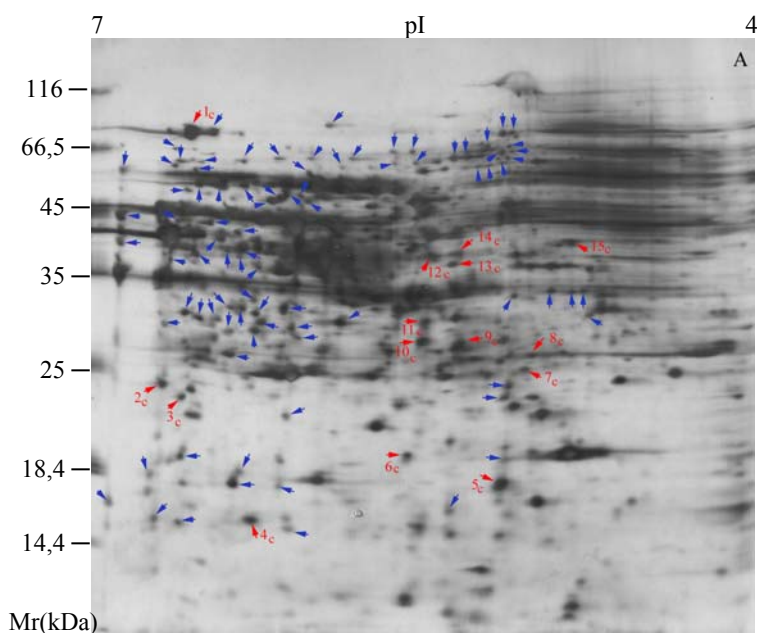
Preglednica 11: Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2-h izpostavitvi 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov. Lise, ki so označene z rdečimi številkami, so na profilu A bolj izražene. Lise, ki so označene z zelenimi številkami, so bolj izražene na profilu E.

številka lise	kvocient R ^b	številka lise	kvocient R ^b
represija sinteze		12b	- 5,2
1b	- 2,8	13b	- 2,8
2b	- 2,6	14b	- 3,4
3b	- 3,3	15b	- 2,4
4b	- 3,0	indukcija sinteze	
5b	- 5,6	16b	+ 9,8
6b	- 2,1	17b	+ 2,3
7b	- 10,0	18b	+ 5,2
8b	- 7,2	19b	+ 8,2
9b	- 5,2	20b	+ 5,6
10b	- 2,2	21b	+ 3,8
11b	- 4,2	22b	+ 4,8

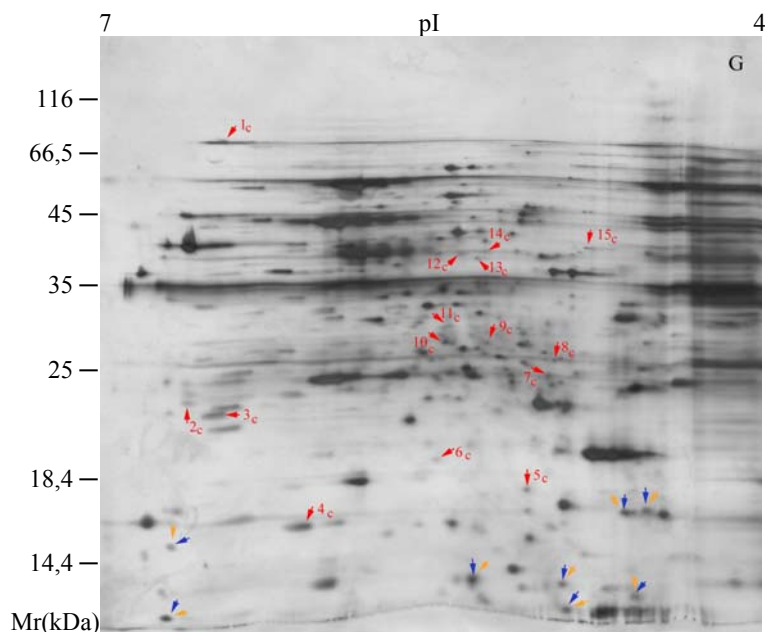
^b = razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega vzorca in vzorca tretiranega 2 h z 10 mM konc. Cr(III), izraženo glede na kontrolo

Na proteinskem profilu po 2-h izpostavitvi 10 mM konc. Cr(III) lahko opazimo le manjše spremembe. Prišlo je do odsotnosti 14 proteinov, do represije sinteze 15 proteinov, indukcijo sinteze 7 proteinov in *de novo* sinteze 10 proteinov.

4.3.3 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 2 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 h s kombinacijo obeh ionov



Slika 8: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (A).



Slika 9: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 10 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM Fe(III) in 10 mM Cr(III)(G), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.

Obrazložitev pomena izbranih barvnih puščic, ki označujejo posamezne 2-D lise na gelih:

modra – lisa je prisotna samo na enem gelu

rdeča – represija sinteze (down regulacija)

zelena – indukcija sinteze (up regulacija)

rumena – lisa, ki se pojavlja na proteinskih profilih C, D, G, H

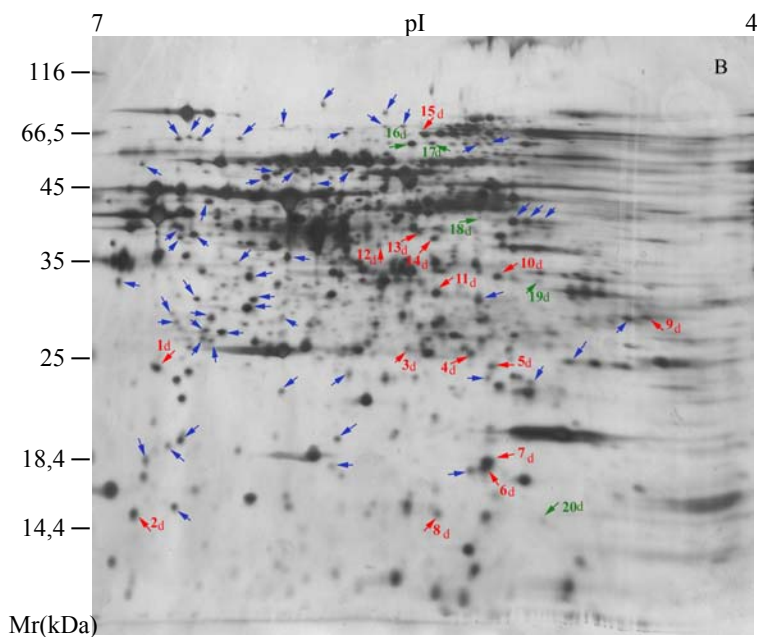
Preglednica 12: Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2-h sočasni izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom in 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 2 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov. Lise, ki so označene z rdečimi števkami, so na profilu A bolj izražene.

številka lise	kvocient R ^c	številka lise	kvocient R ^c
represija sinteze		8c	- 3,8
1c	- 4,4	9c	- 3,4
2c	- 3,5	10c	- 2,5
3c	- 2,7	11c	- 5,3
4c	- 2,8	12c	- 2,1
5c	- 6,5	13c	- 3,4
6c	- 4,2	14c	- 2,5
7c	- 6,3	15c	- 7,1

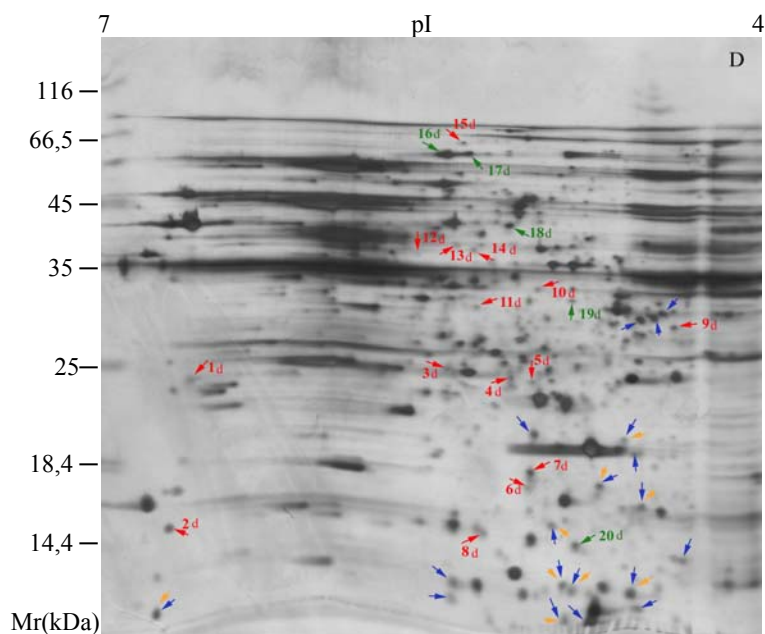
^c = razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega vzorca in vzorca tretiranega 2 h z 2,5 mM konc. Fe(III) in 10 mM konc. Cr(III), izraženo glede na kontrolo

Sočasna 2-h izpostavitve celic 2,5 mM konc. Fe(III) in 10 mM konc. Cr(III) povzroči odsotnost velikega števila proteinov predvsem v pI območju 5 – 7 in območju molekulskih mas 25 – 120 kDa. Pojavi se *de novo* sinteza 8 proteinov, katerih molekulska masa je nižja od 18,4 kDa.

4.3.4 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 4 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 4 h z 2,5 mM konc. Fe(III) ioni



Slika 10: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (B).



Slika 11: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM konc. Fe(III) ionov (D), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.

Obrazložitev pomena izbranih barvnih puščic, ki označujejo posamezne 2-D lise na gelih:

modra – lisa je prisotna samo na enem gelu

rdeča – represija sinteze (down regulacija)

zelená – indukcija sinteze (up regulacija)

rumena – lisa, ki se pojavlja na proteinskih profilih C, D, G, H

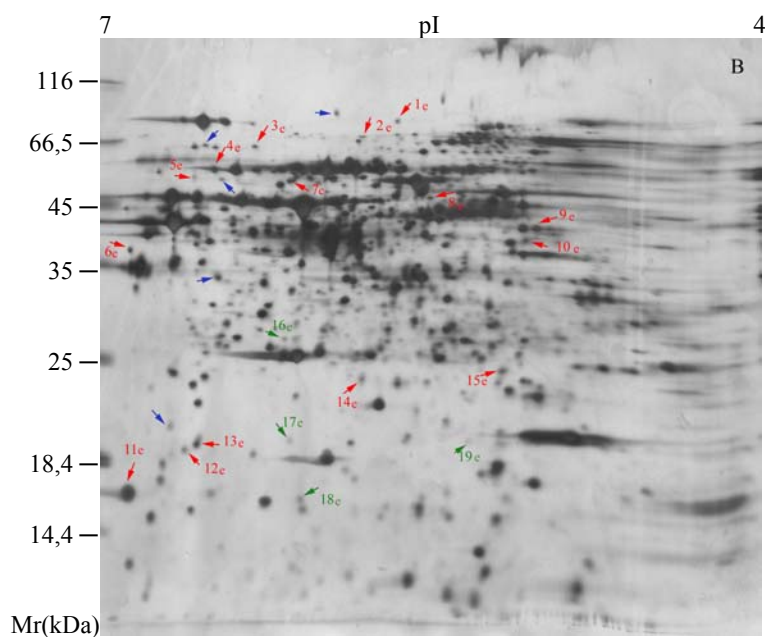
Preglednica 13: Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4-h izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov. Lise, ki so označene z rdečimi številkami, so na profilu B bolj izražene. Lise, ki so označene z zelenimi številkami, so bolj izražene na profilu D.

številka lise	kvocient R ^d	številka lise	kvocient R ^d
represija sinteze		11d	- 6,7
1d	- 2,5	12d	- 3,2
2d	- 2,1	13d	- 2,3
3d	- 2,0	14d	- 2,2
4d	- 3,1	15d	- 4,6
5d	- 3,1	indukcija sinteze	
6d	- 6,1	16d	+ 2,2
7d	- 2,7	17d	+ 2,5
8d	- 2,1	18d	+ 3,5
9d	- 3,6	19d	+ 2,2
10d	- 4,5	20d	+ 2,8

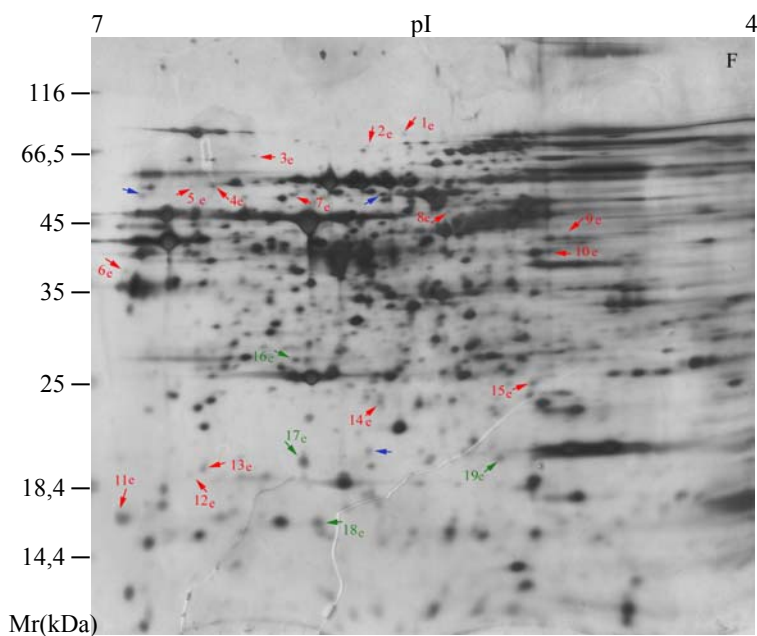
^d = razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega vzorca in vzorca tretiranega 4 h z 2,5 mM konc. Fe(III), izraženo glede na kontrolo

4-h izpostavitve celic 2,5 mM konc. Fe(III) ionom povzroči predvsem odsotnost sinteze proteinov in represijo sinteze proteinov. Poleg tega je opazna tudi *de novo* sinteza 19 proteinov, od katerih se jih 8 pojavi tudi po 2-h izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom.

4.3.5 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 4 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 4 h z 10 mM konc. Cr(III) ioni



Slika 12: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti, brez prisotnosti kovinskih ionov (B).



Slika 13: 2-D analiza proteinskega profila ekstrakta celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 4 urah kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 10 mM konc. Cr(III)(F), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.

Obrazložitev pomena izbranih barvnih puščic, ki označujejo posamezne 2-D lise na gelih:

modra – lisa je prisotna samo na enem gelu

rdeča – represija sinteze (down regulacija)

zelená – indukcija sinteze (up regulacija)

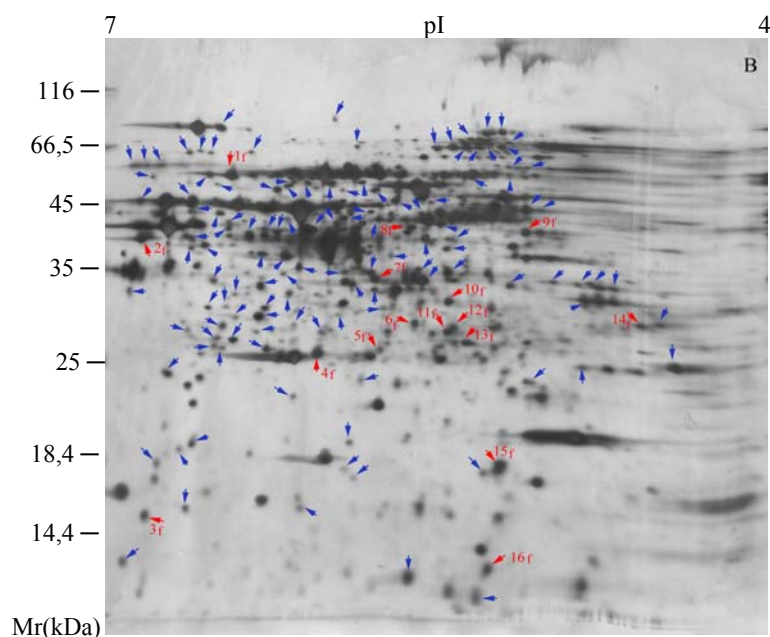
Preglednica 14: Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4-h izpostavitvi 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov. Lise, ki so označene z rdečimi številkami, so na profilu B bolj izražene. Lise, ki so označene z zelenimi številkami, so bolj izražene na profilu F.

številka lise	kvocient R ^e	številka lise	kvocient R ^e
represija sinteze		11e	- 2,9
1e	- 2,2	12e	- 6,3
2e	- 4,7	13e	- 3,8
3e	- 3,3	14e	- 2,2
4e	- 5,6	15e	- 2,3
5e	- 3,5	indukcija sinteze	
6e	- 6,0	16e	+ 2,5
7e	- 3,6	17e	+ 4,3
8e	- 2,9	18e	+ 3,8
9e	- 2,2	19e	+ 5,8
10e	- 2,3		

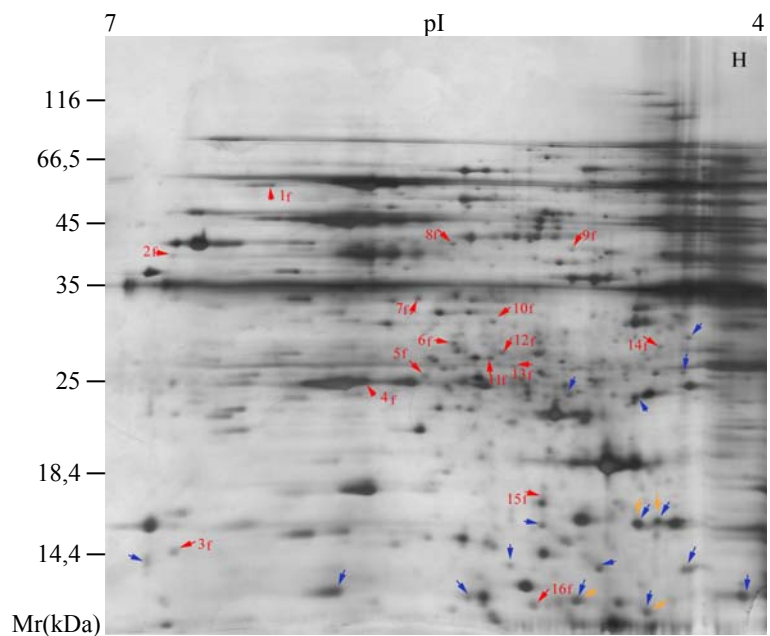
^e = razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega vzorca in vzorca tretiranega 4 h z 10 mM konc. Cr(III), izraženo glede na kontrolo

Na podlagi primerjave proteinskih profilov B in F sklepamo, da 4-h izpostavitve celic 10 mM Cr(III) ionom ne povzroči velikih sprememb v razporeditvi 2-D lis. Prevladuje represija sinteze nekaterih proteinov.

4.3.6 Primerjava proteinskih profilov celičnega ekstrakta kontrole po 4 h od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 4 h s kombinacijo obeh ionov



Slika 14: 2-D analiza proteinskega profila v ekstraktu celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 4 h kultivacije (28 °C, 200 obr./min) od sredine eksponentne faze rasti brez prisotnosti kovinskih ionov (B).



Slika 15: 2-D analiza proteinskega profila v ekstraktu celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 4 h kultivacije (28 °C, 200 obr./min) v prisotnosti 2,5 mM Fe(III) in 10 mM Cr(III) (H), ki smo jih dodali v sredini eksponentne faze rasti.

Obrazložitev pomena izbranih barvnih puščic, ki označujejo posamezne 2-D lise na gelih:

modra – lisa je prisotna samo na enem gelu

rdeča – represija sinteze (down regulacija)

zelena – indukcija sinteze (up regulacija)

rumena – lisa, ki se pojavlja na proteinskih profilih C, D, G, H

Preglednica 15: Primerjava intenzitet 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4-h sočasni izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionom in 10 mM konc. Cr(III) ionom z intenzitetami 2-D lis proteinskega profila ekstrakta celic po 4 urni kultivaciji od sredine eksponentne faze, brez dodatka kovinskih ionov. Lise, ki so označene z rdečimi številkami, so na profilu B bolj izražene.

številka lise	kvocient R^f	številka lise	kvocient R^f
Represija sinteze		9f	- 9,5
1f	- 3,1	10f	- 3,3
2f	- 6,8	11f	- 2,5
3f	- 2,1	12f	- 3,4
4f	- 2,4	13f	- 7,3
5f	- 2,2	14f	- 3,1
6f	- 3,0	15f	- 6,8
7f	- 3,0	16f	- 2,5
8f	- 2,5		

f = razmerje intenzitet 2-D lis kontrolnega vzorca in vzorca tretiranega 4 h z 2,5 mM konc. Fe(III) in 10 mM konc. Cr(III), izraženo glede na kontrolo

Proteinska profila B in H se po razporeditvi 2-D lis zelo razlikujeta. Na profilu H je opaziti odsotnost velikega števila proteinov in represijo sinteze 16 proteinov. Pojavi se tudi *de novo* sinteza 16 proteinov, od katerih se 4 pojavljajo tudi na profilih C, D in G v območju molekulske mase pod 18,4 kDa in pI območju 4 – 5.

Cr(III) ioni in Fe(III) ioni so v nizkih koncentracijah esencialni za celico (Kruszewski, 2003; Mutuma in sod., 1999). Višje koncentracije Fe(III) ionov so toksične in inducirajo tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki posledično vodijo do poškodb na celičnem in molekularnem nivoju (De Freitas in sod., 2003). Znano je, da tudi Cr(III) lahko povzroči tvorbo ROS (Ozawa in Hannaki, 1990). Reducirane oblike Fe(II) in Cr(II) reagirajo z začetnimi slabo reaktivnimi intermedii kisika (superoksidni anion, vodikov peroksid) in jih pretvorijo v visoko reaktivne oblike, katerih tarča je DNK, proteini in celična membrana, pri kateri pride do postopnega uničevanja strukture in funkcije (De Freitas in sod., 2003; Eide in sod., 1992; Ozawa in Hannaki, 1990).

V nalogi smo skušali pojasniti vpliv dodatka 2,5 mM konc. Fe(III) ionov ali 10 mM konc. Cr(III) ionov ali kombinacije 2,5 mM konc. Fe(III) ionov in 10 mM konc. Cr(III) na celico na ravni proteoma. Izvedli smo 2-D elektroforezo proteinov celičnega ekstrakta v območju molekulske mase 10 – 120 kDa in pI območju 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev smo primerjali s proteinskimi profili netretiranih vzorcev po 2 ali 4-h izpostavitvi z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Vpliv kovinskih ionov na celico smo spremljali tudi na fiziološkem nivoju s spremljanjem rasti kvasovke z merjenjem OD₆₅₀.

Pri dodatku (slika 2) 10 mM konc. Cr(III) ionov v gojišče v sredini eksponentne faze rasti smo opazili, da je prišlo do manjše inhibicije hitrosti rasti kvasovke *S. cerevisiae*, medtem ko je dodatek 2,5 mM konc. Fe(III) že povzročil skorajšno zaustavitev rasti *S. cerevisiae*. Podoben učinek kot dodatek 2,5 mM konc. Fe(III) je imel tudi sočasen dodatek Fe(III) in Cr(III) ionov, s slike 2 je bilo namreč razvidno, da obe rastni krivulji potekata zelo podobno.

Manjši vpliv dodatka 10 mM konc. Cr(III) celicam se odraža tudi na proteinskem profilu ekstrakta celic po 2-h (primerjava proteinskih profilov: slika 6 in 7) in 4-h (primerjava proteinskih profilov: slika 12 in 13) izpostavitvi. Proteinski profil ekstrakta celic tretiranih z 10 mM konc. Cr(III) smo primerjali s proteinskim profilom kontrole in pri primerjavi opazili le manjše spremembe proteinskega profila. Prišlo je do odsotnosti določenih proteinov (ustrezne 2-D lise so označene z modrimi puščicami na proteinskem profilu: slika 6 in 12) in do represije sinteze nekaterih proteinov (ustrezne 2-D lise so označene z rdečimi puščicami na proteinskem profilu: slika 7 in 13), kar je verjetno pripomoglo k manjši inhibiciji hitrosti rasti. Primerjava intenzitet 2-D lis (preglednica 11, 14) je pokazala represijo sinteze za faktor 2 - 8. Opažene so bile tudi lise, katerih intenziteta se je za faktor 2 – 10 povečala. 2-h izpostavitvev Cr(III) ionom je povzročila indukcijo sinteze 7 proteinov (ustrezne lise so označene z zelenimi puščicami na proteinskem profilu: slika 7), 4-h pa 5 (ustrezne lise so označene z zelenimi puščicami na proteinskem profilu: slika 13), vendar ne istih proteinov. Dodatek Cr(III) je povzročil tudi *de novo* sintezo proteinov, predvsem v območju pI 6 - 7 in območju molekulske mase 10 - 120 kDa. Po 2-h izpostavitvi se je pojavilo 10 novih proteinov (ustrezne 2-D lise so označene z modrimi puščicami na proteinskem profilu: slika 7) po 4-h pa 3 (ustrezne lise so označene z modrimi puščicami na proteinskem profilu: slika 13), vendar ne isti proteini. Proteinska profila kontrole po 2 h in 4 h kultivacije od sredine eksponentne faze rasti in ekstrakta celic tretiranih 2 in 4 h s 10 mM konc. Cr(III) sta si v razporeditvi 2-D lis zelo podobna, medtem ko to ne velja za proteinske profile celičnih ekstraktov tretiranih z 2,5 mM Fe(III) (primerjava proteinskih profilov: slike 4, 5 in slike 10, 11) ali s kombinacijo obeh ionov (primerjava proteinskih

profilov: slike 8, 9 in 14, 15). Izpostavitve celic Fe(III) ionom in kombinaciji obeh ionov je povzročila podobno spremembo v proteinskem profilu, ta pa se je močno razlikovala od kontrole. Opazili smo odsotnost velikega števila proteinov (ustrezne 2-D lise so označene z modrimi puščicami na proteinskih profilih: slike 4, 8, 10, 14) z molekulsko maso v območju 35 - 120 kDa in pI območju 4 - 7 in represijo sinteze mnogih proteinov (ustrezne 2-D lise so označene z rdečimi puščicami na proteinskih profilih: slike 5, 9, 11, 15) za faktor 2 - 10 (preglednice 10, 12, 13, 15). Sočasna izpostavitve celic Cr(III) in Fe(III) ionom ali samo Fe(III) ionom povzroči tudi pojav *de novo* sintetiziranih proteinov (ustrezne 2-D lise so označene z modrimi puščicami na proteinskih profilih: slike 5, 9, 11, 15). Za te proteine je značilna nizka molekulska masa, pod 25 kDa, in pI v območju 4 - 5. Po 2-h tretiranju s 2,5 mM konc. Fe(III) smo na proteinskem profilu opazili 15 novih proteinov (ustrezne 2-D lise so na sliki 5 označene z modrimi puščicami), medtem ko je bilo po 2-h tretiranju s kombinacijo obeh ionov, 8 novih proteinov (ustrezne 2-D lise so na sliki 9 označene z modrimi puščicami). Po podrobnejši primerjavi smo ugotovili, da se teh 8 proteinov pojavlja na obeh proteinskih profilih, torej lahko sklepamo, da celica po 2-h izpostavitvi Fe(III) ionom ali kombinaciji, *de novo* sintetizira 8 istih proteinov, ki so na proteinskih profilih (slika 5 in 9) še dodatno označene z rumenimi puščicami. Večina teh *de novo* sintetiziranih proteinov je po 4-h izpostavitvi Fe(III) še vedno prisotna (ustrezne 2-D lise so na sliki 11 označene z modrimi in rumenimi puščicami), pojavi pa se še 10 novih proteinov, ki so na sliki 11 označeni samo z modrimi puščicami. Tudi na proteinskem profilu po 4-h izpostavitvi kombinaciji obeh ionov je opaziti 4 proteine (ustrezne 2-D lise so na sliki 15 označene z modrimi in rumenimi puščicami), ki se pojavljajo na proteinskih profilih po 2 in 4-h izpostavitvi Fe(III) in 2-h izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III). Poleg tega je opazen še dodaten pojav novih 7 proteinov (ustrezne 2-D lise so na sliki 15 označene z modrimi puščicami), med katerimi pa ni noben skupen *de novo* sintetiziran proteinom, ki se pojavijo po 4-h tretiranju s samo Fe(III) ioni. Po primerjavi proteinov, katerih *de novo* sintezo je povzročila 2 ali 4-h izpostavitve Fe(III) ionom ali kombinaciji s *de novo* sintetiziranimi proteini po 2 in 4-h izpostavitvi Cr(III) ionom, smo ugotovili da ni skupnih proteinov, kar nakazuje na drugačen odziv celice.

Čeprav na sliki 2 ni razvidna posebna razlika v poteku rasti krivulj celic tretiranih s 2,5 mM konc. Fe(III) ali s kombinacijo obeh kovinskih ionov, pa se na proteinskih profilih kažejo tudi razlike. Kombinacija obeh ionov je povzročila še dodatno represijo sinteze nekaterih proteinov (ustrezne 2-D lise so na slikah 9 in 15 označene z rdečimi puščicami) in dodatno odsotnost proteinov (ustrezne 2-D lise so na slikah 8 in 14 označene z modrimi puščicami), predvsem tistih z molekulsko maso višjo od 35 kDa in pI v območju 4 - 7. Razlike se kažejo tudi v indukciji sinteze proteinov. Po 2-h izpostavitvi Fe(III) ionom je prišlo do indukcije sinteze 8 proteinov (ustrezne 2-D lise so na sliki 5 označene z zelenimi puščicami), po 4-h 5 (ustrezne 2-D lise so na sliki 11 označene z zelenimi puščicami), vendar ne istih proteinov. Ti proteini se pojavljajo v pI območju 4 - 5 in območju molekulske mase 14 - 66 kDa. Primerjava intenzitet 2-D lis (preglednica 10, 13) je pokazala indukcijo sinteze za faktor 2 - 4. Po izpostavitvi kombinaciji ionov indukcije sinteze proteinov nismo opazili.

Inhibicija rasti kvasovke in spremembe v proteinskem profilu po izpostavitvi kovinskimi ionom nakazujejo na stresne pogoje v okolju. Spremembe v celici na biokemijski ravni so običajno med prvimi zaznavnimi odgovori na spremembe v okolju (Bierkens, 2000), kar se

odraža tudi v našem primeru, saj je iz proteinskih profilov tretiranih vzorcev razvidno, da je prišlo do sprememb v izražanju proteinov. Stresni pogoji so povzročili indukcijo molekularnih mehanizmov, ki jih splošno označujemo tudi stresni odgovori (Sanchez in sod., 1992). Njihova naloga je zaščititi celico pred potencialno škodljivimi vplivi stresnih dejavnikov, v tem primeru kovinskih ionov in popraviti že povzročene poškodbe ter ustvariti tolerantno stanje, ki pomaga ščititi pred nadaljnimi poškodbami (Mager in Hohmann, 1997). Povečana produkcija ROS v celici sproži indukcijo antioksidativnih obrambnih sistemov, ko pa ti postanejo neučinkoviti, posledično nastopi oksidativni stres, ki vodi v apoptozo (Jamieson, 1998; Temple in sod., 2005).

Glede na potek rasti in primerjave proteinskih profilov lahko sklepamo, da Fe(III) ioni predstavljajo za celico bistveno večji stres kot pa Cr(III) ioni. To potrjujejo tudi izbrane koncentracije Fe(III) in Cr(III) ionov, saj je bila uporabljena koncentracija železa za 4 krat manjša od koncentracije kroma, inhibični učinek Fe(III) pa vseeno bistveno večji od učinka Cr(III). Na podlagi rezultatov lahko rečemo, da se stresni odgovor kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III) ionov in posameznim Fe(III) razlikuje od odgovora po izpostavitvi posameznim Cr(III) ionom.

Ugotavljamo, da pride zaradi stresa, ki ga v celici povzroči Fe(III) ioni ali kombinacija Fe(III) in Cr(III) ionov, do drugačnih sprememb v izražanju proteinov kot pri dodatku posameznih Cr(III) ionov. Za razliko od Fe(III) so te spremembe pri Cr(III) manj obsežne, vključujejo odsotnost le manjšega števila proteinov in represijo ter indukcijo sinteze le nekaterih proteinov, drugače pa kaže razporeditev lis pri Cr(III) na veliko podobnost s kontrolo. Železo je namreč redoks aktivna kovina. Reducirana oblika Fe(II) v Fentonovi reakciji s H_2O_2 katalizira nastanek visoko reaktivnega hidroksilnega radikala. Oksidirana oblika Fe(III) se potem s pomočjo superoksidnega radikala v Haber/Weissovi reakciji reducira nazaj v Fe(II), ki se s H_2O_2 ponovno oksidira. Indukcija sinteze proteinov pri izpostavitvi Fe(III) ionom bi lahko bila posledica indukcije antioksidativnih obrambnih sistemov (primarnih in sekundarnih), sistemov za razgradnjo oksidativno poškodvanih proteinov ali stresnih proteinov, ki imajo nalogo, da odstranjujejo ali sodelujejo pri odstranjevanju ROS (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Omenjeni *de novo* sintetizirani proteini, ki se pojavijo po izpostavitvi tako Fe(III) ionom kot tudi kombinaciji obeh ionov, bi lahko bili vključeni v proces apoptoze.

Manjšo toksičnost Cr(III) ionov si lahko razlagamo iz dejstva, da Cr(III) težje prehaja celične membrane. Cr(III) namreč tvori heksakoordinatne komplekse, ki zaradi svoje geometrije in pozitivnega naboja slabo prehajajo skozi celično membrano (Raspor in sod., 1999; Sugden in sod., 1992). Vstop je možen le s pasivnim transportom oziroma fagocitozo, membranski proteini za aktiven transport niso znani (Blasiak in Kowalik, 2000). Dolgo časa je veljalo, da je Cr(III) netoksična, stabilna oblika. Določene raziskave pa so pokazale, da je Cr(III) aktivna biološka in oksidacijska oblika, ki je vključena v redoks kroženje, pri čemer nastajajo ROS. Cr(III) se v celicah s pomočjo bioloških reductentov L-cisteina ali NADH lahko reducira do Cr(II), kateri potem reagira s H_2O_2 in tvori hidroksilni radikal (Ozawa in Hannaki, 1990; Stohs in Bagchi, 1995). Velika verjetnost v našem primeru je, da do te redukcije v celici ni prišlo in tako tudi do nastanka ROS, ki bi povzročile oksidativni stres in posledično primeren stresni odgovor celice, ob dejstvu seveda, da je sploh prišlo do transporta Cr(III) v celico. Rahlo inhibicijo hitrosti

rasti in posledično nekoliko spremenjen proteinski profil bi lahko povzročil tudi Cr(III) sam, saj lahko reagira, predvsem zaradi svoje heksakoordinatne narave, s številnimi celičnimi makromolekulami in tako vpliva na njihovo delovanje in sintezo (Kareus in sod., 2001). Veže se lahko na DNK ali proteine, ki potem tvorijo povezave Cr-DNK ali Cr-DNK-proteini (Voitkun in sod., 1998; Zhitkovich in sod., 1995, 2001). Takšne povezave so lahko za celico usodne, saj vplivajo lahko na najbolj osnovne procese v celici, kot sta podvajanje DNK in izražanje genov (Snow, 1991; Snow, 1994; Sugden in sod., 1992). Posledica takega delovanja Cr(III) bi lahko bila represija sinteze nekaterih proteinov.

Za natančno identifikacijo proteinov, katerih izražanje je bilo v stresnih razmerah spremenjeno, bi bilo potrebno uporabiti še dodatne tehnike, kot so: masna spektrometrija, določanje zaporedja aminokislin, imunodetekcija s specifičnimi protitelesi, itd. (Maillet in sod., 1996).

5 SKLEPI

Iz spremljanja OD₆₅₀ je razvidno, da je dodatek 10 mM konc. Cr(III) ionov v sredini eksponentne faze rasti povzročil rahlo inhibicijo hitrosti rasti kvasovke *S. cerevisiae*, medtem ko je dodatek 2,5 mM konc. Fe(III) ionov ali kombinacije 2,5 mM konc. Fe(III) in 10 mM Cr(III) ionov povzročil popolno inhibicijo rasti.

Razporeditev 2-D lis na proteinskih profilih po izpostavitvi celic posameznim Fe(III) ionom ali sočasni izpostavitvi Fe(III) in Cr(III) ionom je podobna, medtem ko se zelo razlikuje od razporeditve 2-D lis na proteinskem profilu kontrole. Opazna je bila represija sinteze proteinov in odsotnost proteinov, predvsem v območju molekulske mase 35 – 120 kDa in pI 4 - 7. Po primerjavi razporeditve 2-D lis na proteinskem profilu po izpostavitvi celic posameznim Cr(III) ionom z razporeditvijo 2-D lis na proteinskih profilih kontrole, smo ugotovili veliko podobnost.

Po 2-h izpostavitvi 2,5 mM konc. Fe(III) ionov ali kombinaciji obeh ionov je bilo moč opaziti tudi *de novo* sintezo 8 istih proteinov (ustrezne lise so na slikah 5 in 9 označene z rumenimi puščicami) katerih značilna je bila nizka molekulska masa (pod 25 kDa) in pI v območju 4 – 5. Po 2-h izpostavitvi Cr(III) ionom teh proteinov nismo opazili.

Kombinacija obeh ionov je povzročila še dodatno represijo sinteze in odsotnost proteinov. Dodatek samih Fe(III) ionov je povzročil tudi indukcijo sinteze proteinov v območju pI 4 - 5 in molekulske mase 14 - 66 kDa, medtem ko po izpostavitvi kombinaciji ionov ta ni bila več opazna.

Inhibicijo rasti kvasovke in spremembe v proteinskem profilu po izpostavitvi kovinskim ionom pripisujemo stresnim pogojem. Stresni odgovor kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III) ionov ali posameznim Fe(III) ionom se tipično razlikuje od stresnega odgovora po izpostavitvi posameznim Cr(III) ionom, kar se odraža tako na fiziološkem nivoju kot na nivoju proteoma.

6 POVZETEK

Fe(III) in Cr(III) ioni so v majhnih količinah nujno potrebni za nemoteno delovanje živih organizmov (Kruszewski, 2003; Mutuma in sod., 1999). Glede na dejstvo, da je Fe(III) redoks aktivna kovin, ima pomembno vlogo tudi pri nastajanju reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v celici, ki posledično vodijo do poškodb na celičnem in molekularnem nivoju (De Freitas in sod., 2003). Znano je, da tudi Cr(III) lahko povzroči tvorbo ROS (Ozawa in Hannaki, 1990). V nalogi smo skušali pojasniti vpliv dodatka Fe(III) ionov, Cr(III) ionov in sočasnega dodatka Fe(III) in Cr(III) v sredini eksponentne faze rasti na celico na ravni proteoma. Izvedli smo 2-D elektroforezo proteinov celičnega ekstrakta v območju molekulske mase 10 – 120 kDa in pI območju 4 - 7. Proteinske profile tretiranih vzorcev smo primerjali s proteinskimi profili netretiranih vzorcev po 2 ali 4-h izpostavitvi z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Vpliv kovinskih ionov na celico smo spremljali tudi na fiziološkem nivoju, in sicer z merjenjem OD₆₅₀. Iz poteka rasti krivulj smo ugotovili, da je bila pri vseh prisotna inhibicija rasti, vendar je dodatek Cr(III) ionov povzročil opazno manjšo inhibicijo hitrosti rasti kot pa dodatek Fe(III) ionov ali kombinacije obeh ionov. Spremembe v celici na biokemijski ravni so običajno med prvimi zaznavnimi odgovori na spremembe v okolju (Bierkens, 2000), kar se je odražalo tudi v našem primeru, saj je iz proteinskih profilov tretiranih vzorcev razvidno, da je prišlo do sprememb v izražanju proteinov. Izpostavitve celic Fe(III) ionom in kombinaciji obeh ionov je povzročila podobno spremembo v proteinskem profilu, ta pa se je močno razlikovala od kontrole. Opazna je bila represija sinteze mnogih proteinov in odsotnost velikega števila proteinov, predvsem v območju molekulske mase 35 – 120 kDa in pI 4 - 7. 2-h izpostavitve celic Fe(III) ionov ali kombinaciji obeh ionov je povzročila tudi *de novo* sintezo 8 istih proteinov, katerih značilna je bila nizka molekulska masa (pod 25 kDa) in pI v območju 4 – 5. Za razliko od kombinacije ionov so posamezni Fe(III) ioni povzročili tudi indukcijo sinteze proteinov. Spremembe proteinskega profila pri izpostavitvi Cr(III) ionom so bile manj obsežne, vključevale so odsotnost le manjšega števila proteinov in represijo ter indukcijo sinteze le nekaterih proteinov, drugače pa je kazala razporeditev 2-D lis veliko podobnost s proteinskim profilom kontrole. Inhibicija rasti kvasovke in spremembe v proteinskem profilu po izpostavitvi kovinskim ionom, nakazujejo na stresne pogoje v okolju. Celica je verjetno inducirala molekularne mehanizme, ki jih v splošnem označujemo stresni odgovori in imajo nalogo zaščite celice pred potencialno škodljivimi učinki stresa in popravijo že nastale poškodbe (Mager in Hohmann, 1997). Na podlagi rezultatov ugotavljamo, da se stresni odgovor kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi kombinaciji Fe(III) in Cr(III) ionov ali posameznim Fe(III) ionom razlikuje od stresnega odgovora po izpostavitvi posameznim Cr(III) ionom.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-89.
- Aruoma O.I. 1998. Free radicals, oxidants: trend towards the year 2000 and beyond. V: Molecular biology of free radicals in human diseases. Aruoma O.I., Halliwell B.(eds.). Saint Lucia, London, OICA International: 1-28.
- Bagchi D., Stohs S.J., Downs B.W., Bagchi M., Preuss H.G. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180: 5-22.
- Bal W., Lukszo J., Kasprzak K.S. 1997. Mediation of oxidative DNA damage by nickel(II) and cooper(II) complexes with the N-terminal sequence of human protamine HP2. *Chemical Research in Toxicology*, 10: 915-921.
- Bal W., Jezouska-Bojczuk M., Kasprzak K.S. 1997. Binding of nickel(II) and cooper(II) to the N-terminal sequence of human protamine HP2. *Chemical Research in Toxicology*, 10: 906-914.
- Bal W., Wojcik J., Maciejczyk M., Grochowski P., Kasprzak K.S. 2000. Induction in the secondary structure in the N-terminal pentadecapeptide of human protamine HP2 through Ni(II) coordination. An NMR study. *Chemical Research in Toxicology*, 13: 823-830.
- Barceloux D.G. 1999. Chromium. *Clinical Toxicology*, 37, 2: 173-194.
- Bierkens J.G.E.A. 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, 153: 61-72.
- Blasiak J., Kowalik J. 2000. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutation Research*, 429. 135-145.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 335-347.
- Chen W., Ji J., Xu X., He S., Ru B. 2003. Proteomic comparison between human young and old brains by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 21, 4: 209-216.
- Chipperfield J.R. 2003. Iron. Properties and determination. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. Vol. 5. Caballero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3367-3373.

Chromium report. 1998. Cedar Mill, Vitality Fit.

<http://www.primev.com/Chromium.htm> (maj 2007): 6 str.

Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. Review. Molecular Aspect of Medicine, 22: 217-246.

Davies K.J.A. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie, 83: 301-310.

Davies M.C., Sumrall H.K., Vincent J.B. 1996. A biologically active form of chromium may activate a membrane phosphotyrosine phosphatase (PTP). Biochemistry, 35: 12963-12969.

De Freitas J., Meneghini R. 2001. Iron and its sensitive balance in the cell. Mutation Research, 475: 153-159.

De Freitas J., Wintz H., Kim H. J., Poynton H., Fox T., Vulpe C. 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism structures. BioMetals, 16: 185-197.

Eide D., Davis-Kaplan S., Jordan I., Sipe D., Kaplan J. 1992. Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 267, 29: 20774-20781.

Fent K. 1998. Ökotoxikologie. Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 15-19.

Fountoulakis M., Juranville J.F., Roeder D., Evers S., Berndt P., Langen H. 1998. Reference map of the low-molecular mass proteins of *Haemophilus influenzae*. Electrophoresis, 19: 1819-1827.

Fountoulakis M. 2001. Proteomics: current technologies and applications in neurological disorders and toxicology. Amino Acids, 21, 4: 363-381.

Goffeau A., Kolaczowski M., Decottignies A., Balzi E. 1997. Solubilization and characterisation of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. V: Microbial response to stress: what's new and how can it be applied? EFB Working Party Physiology Symposium, Sesimbra, Portugalska, 15-18. mar. 1997. Sesimbra, European Federation of Biotechnology, Sociedade Portuguesa de Biotechnologia: 104-123.

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

Greenwood N.N., Earnshaw A. 1998. Chemistry of the elements. 2nd ed. Oxford, Butterworth-Heinemann: 1341 str.

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

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

Hurrell R. 2002. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutrition Reviews*, 60, 7: S7-S15.

Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 16: 1511-1527.

Jamnik P. 2007. Proteomika. V: Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Raspor P., Kuščer E. (eds.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 268-272.

Jamnik P., Raspor P. 2005a. Induction of Hsp 104 by Cr(IV) in yeast *Candida intermedia*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85, 1: 67-72.

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

Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 6: 316-323.

Kareus S.A., Kelley C., Walton H.S., Sinclair P.R. 2001. Release of Cr(III) from Cr(III) picolinate upon metabolic activation. *Journal of Hazardous Materials*, 84: 163-174.

Kasprzak K.S. 2002. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 10: 958-967.

Klein C.B., Snow E.T., Frenkel K. 1998. Molecular mechanisms in metal carcinogenesis: role of oxidative stress. V: Molecular biology of free radicals in human diseases. Auroma O.I., Halliwell B. (eds.). Saint Lucia, London, OICA International: 79– 37.

Kosman J.D. 2003. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Molecular Microbiology*, 47, 5: 1185–1197.

Kruszewski M. 2003. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to the oxidative stress. *Mutation Research*, 531: 81-92.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 15: 680-685.

Lahm H.W., Langen H. 2000. Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis*, 21: 2105-2114.

- Lamson W.D., Plaza M.S. 2002. The safety and efficacy of high-dose chromium. *Alternative Medicine Review*, 7, 3: 218-233.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 223: 346-357.
- Losi M.E., Amrhein C., Frankenberger Jr. W.T. 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 136: 91-115.
- Lubec G., Krapfenbauer K., Fountoulakis M. 2003. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in Neurobiology*, 69:193-211.
- Lynch S. 2002. Food iron absorption and its importance for the design of food fortification strategies. *Nutrition Reviews*, 60, 7: S3-S6.
- Mager W.H., Hohmann S. 1997. Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 1-5.
- Maillet I., Lagniel G., Perrot M., Boucherie H., Labarre J. 1996. Rapid identification of yeast proteins on two-dimensional gels. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 17: 10263-10270.
- Manček B., Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farmacevtski vestnik*, 52: 133-44.
- March B. 1992. *Advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms and structure*. 4th ed. New York, John Willey & Sons: 165-204.
- Meneghini R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 5: 783-792.
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19, 4: 651-658.
- Moradas-Ferreira P., Costa V. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defence, damage and death. *Redox Report*, 5,5: 277-285.
- Mutuma S., Amuna P., Shukla H., Sumar S. 1999. Chromium in food, nutrition and health - an introduction. *Nutrition & Food Science*, 2: 81-88.
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 1152 str.
- Nordberg J., Arner E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 1287-1312.

- O'Brien T., Mandel H.G., Pritchard D.E., Patierno S.R. 2002. Critical role of chromium (Cr)-DNA interactions in the formation of Cr-induced polymerase arresting lesions. *Biochemistry*, 41: 12529-12537.
- O'Brien T., Ceryak S., Patierno S.R. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation research*, 533: 3-36.
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 4007-4021.
- Ozawa T., Hannaki A. 1990. Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of the biological reductants: Is Cr (III) nontoxic? *Biochemistry International*, 22: 343-352.
- Parsell D.A., Kowal A.S., Singer M.A., Lidquist S. 1994. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp 104. *Nature*, 372, 1: 270-273.
- Pierre J.L., Fontecave M., Crichton R.R. 2002. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals*, 15: 341-346.
- Piper P. 1997. The yeast heat shock response. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 75-99.
- Protein electrophoresis: applications guide. 1994. San Francisco, Hoefer Scientific Instruments: 106 str.
- Raspor P., Batič M., Jamnik P. 1999. Measurement of yeast viability/mortality in the presence of chromium(IV). *Food Technology and Biotechnology*, 37, 2: 81-86.
- Righetti P.G., Gianazza E., Gelfi C., Chiari M. 1990. Isoelectric focusing. V: Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Hames B.D., Rickwood D. (eds.). Oxford, IRL Press: 149-216.
- Ruis H. 1997. Yeast stress responses: achievements, goals and a look beyond yeast. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 231-247.
- Sanchez Y., Taulien J., Borkovich A.K., Lindquist S. 1992. Hsp 104 is required for tolerance to many of forms of stress. *EMBO Journal*, 11, 6: 2357-2364.
- Santoro N., Thiele D.J. 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager, W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 171-211.
- Scopes R.K. 1987. Protein purification: principles and practise. 2nd ed. New York, Springer Verlag: 328 str.

Shackelford E.R., Kaufmann K.W., Paules S.R. 1999. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, genotoxic stress. *Environmental Health Perspectives*, 107, 1: 5-24.

Sheehan D. 2006. Detection of redox-based modification in two-dimensional electrophoresis proteomic separations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394: 455-462.

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

Snow E.T. 1991. A possible role of chromium(III) in genotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, 92: 75-81.

Snow E.T. 1994. Effects of chromium on DNA replication *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*, 3: 41-44.

Speetjes J.K., Collins R.A., Vincent J.B., Woski S.A. 1999. The nutritional supplement chromium(III) tris (picolinate) cleaves DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 13: 483-487.

Stasyk T., Hellman U., Souchelnytskyi S. 2001. Optimizing sample preparation for 2-D electrophoresis. *Life Science News: Amersham Biosciences*, 9: 1-4.

Stearns M. D. 2000. Is chromium a trace essential metal? *Biofactors*, 11: 149–62.

Stohs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 2: 321–336.

Sugden K.D., Geer R.D., Rogers S.J. 1992. Oxygen radical-mediated DNA damage by redox-active Cr(III) complexes. *Biochemistry*, 31: 11626-11631.

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

Temple M.D., Perrone G.G., Dawes I.W. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, 15, 6: 319-326.

Toledano M.B., Delaunay A., Biteau B., Spector D., Azevedo D. 2003. Oxidative stress responses in yeast. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager, W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 241-303.

Toxicological review of hexavalent chromium (CAS No. 18540-29-9). 1998. Washington, U.S. Environmental Protection Agency (EPA)., Integrated Risk Information System (IRIS) (junij 2004).

<http://epa.gov/iris/toxreviews/0144-tr.pdf> (februar 2007): 77 str.

Toxicological review of trivalent chromium (CAS No. 16065-83-1). 1998. Washington, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Integrated Risk Information System (IRIS) (oktober 2003).

<http://epa.gov/iris/toxreviews/0028-tr.pdf> (februar 2007): 51 str.

Voitkun V., Zhitkovich A., Costa M. 1998. Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucleic Acids Research*, 26, 8: 2024-2030.

Walker G.M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester, John Wiley & Sons: 350 str.

Wheeler C.R., Salzman, J.A., Elsayed N.M., Omaye S.T., Korte, D.W. 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry* 184: 193-199.

Whitley D., Goldberg S.P., Jordan W.D. 1999. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, 29, 4: 748-751.

Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium *in vitro*: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry*, 35, 22: 7275-7282.

Zhitkovich A., Song Y., Quievryn G., Voitkun V. 2001. Non-oxidative mechanisms are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry*, 40: 549-560.

Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H., Dunn M.J. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21: 3666-3672.

Yeast nitrogen base without amino acids. 2000. V: Products for life science research. Berlin, Sigma-Aldrich: 236 str.

2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. AB ed. 1998. Uppsala, Pharmacia Biotech: 104 str.

ZAHVALA

Največja zahvala gre somentorici dr. Poloni Jamnik za vodenje pri eksperimentalnem delu in za vse nasvete in pripombe pri pisanju diplomskega dela ter še posebej za vzpodbudne besede, ki so mi bile tekom nastanka diplomskega dela zelo potrebne. Prav tako se zahvaljujem mentorju prof. dr. Petru Rasporju in recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću za pregled in nasvete pri nastanku diplomskega dela.

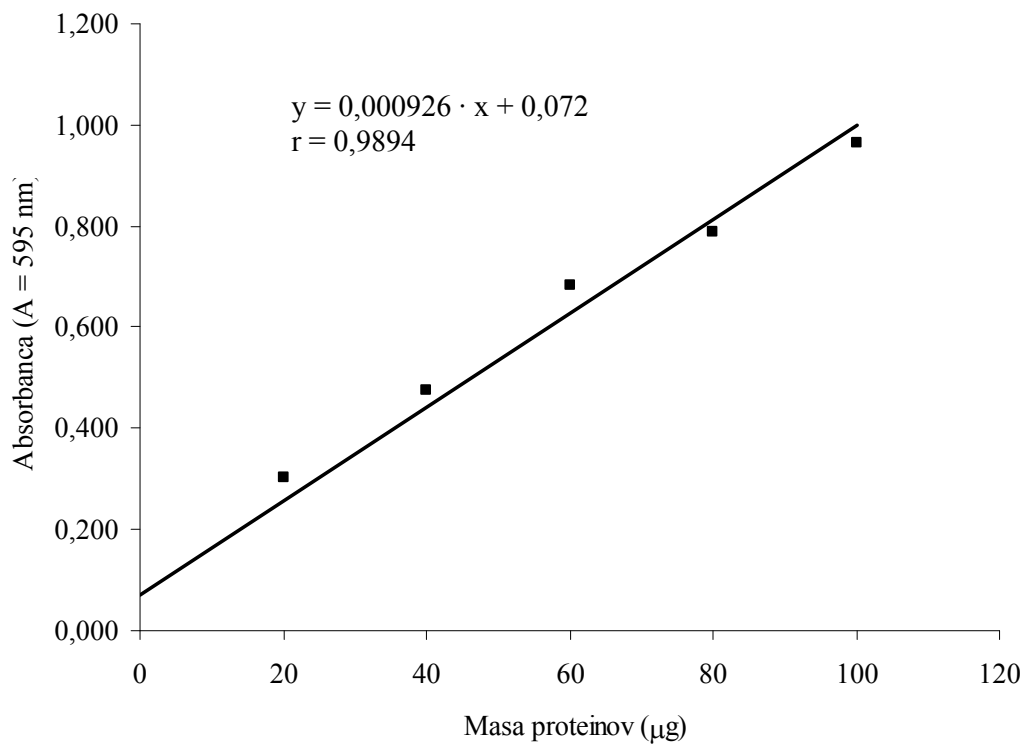
Hvala vsem ostalim sodelavcem Katedre za biotehnologijo za pomoč pri delu v laboratoriju in prijetno vzdušje.

Zahvala gre tudi ga. Ivici Hočevar za pregled diplomske naloge.

Hvala za podporo družini in vsem najbližnjim, še posebej hvala Blažu.

PRILOGE

Priloga A: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu; masa proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA.



Priloga B1: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 brez dodatka kovinskih ionov

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	\bar{X}	SD	KV(%)
0	0,181	0,184	0,182	0,002	1,2%
2	0,193	0,208	0,200	0,011	5,4%
4	0,245	0,277	0,261	0,023	8,7%
6	0,460	0,481	0,471	0,014	3,1%
8	0,735	0,728	0,731	0,005	0,6%
10	1,030	1,090	1,060	0,042	4,0%
12	1,233	1,239	1,236	0,004	0,3%
24	1,371	1,380	1,376	0,006	0,5%

Priloga B2: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 z dodatkom 10 mM konc. Cr(III) ionov

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	\bar{X}	SD	KV(%)
0	0,19	0,20	0,21	0,21	0,20	0,01	4,5%
2	0,23	0,23	0,25	0,25	0,24	0,01	5,0%
4	0,31	0,33	0,36	0,32	0,33	0,02	6,4%
6	0,52	0,56	0,58	0,51	0,55	0,03	6,0%
7,5	0,76	0,76	0,75	0,77	0,76	0,01	0,9%
9,6	1,10	1,03	0,99	1,03	1,04	0,04	4,1%
11,5	1,13	1,14	1,11	1,11	1,12	0,01	1,1%
23,5	1,17	1,21	1,15	1,12	1,16	0,04	3,0%

Priloga B3: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 z dodatkom 2,5 mM konc. Fe(III) ionov

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	\bar{X}	SD	KV(%)
0	0,293	0,194	0,210	0,191	0,222	0,048	21,6%
2	0,248	0,219	0,234	0,214	0,229	0,015	6,7%
4	0,320	0,329	0,303	0,294	0,312	0,016	5,1%
6	0,513	0,555	0,499	0,487	0,514	0,030	5,8%
7,5	0,769	0,753	0,768	0,758	0,762	0,008	1,0%
9,5	0,861	0,896	0,884	0,866	0,877	0,016	1,8%
11,5	0,904	0,955	0,953	0,987	0,950	0,034	3,6%
23,5	1,056	1,083	1,031	1,063	1,058	0,021	2,0%

Priloga B4: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku (200 obr./min, T = 28 °C) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 z dodatkom kombinacije 10 mM konc. Cr(III) ionov in 2,5 mM konc. Fe(III) ionov

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	\bar{X}	SD	KV(%)
0	0,218	0,217	0,218	0,001	0,3%
2	0,259	0,244	0,252	0,011	4,2%
4	0,344	0,388	0,366	0,031	8,5%
6	0,580	0,553	0,567	0,019	3,4%
7,5	0,752	0,756	0,754	0,003	0,4%
9,5	0,885	0,881	0,883	0,003	0,3%
11,5	0,919	0,908	0,914	0,008	0,9%
23,5	1,056	1,065	1,061	0,006	0,6%

Priloga C1: Rezultati prve neodvisne meritve absorbance pri 595 nm in določitev koncentracije proteinov (g/l) posameznih vzorcev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155. Obrazložitev kratic: kontrola po 2 h in 4 h kultivacije od sredine eksponentne faze rasti; 2-h ali 4-h izpostavitve določenim kovinskim ionom.

vzorec	1. meritev				
	faktor redčitve	paralelka A (A ₅₉₅ nm)	paralelka B (A ₅₉₅ nm)	povprečje (A ₅₉₅ nm)	konc. proteinov (g/l)
kontrola po 2 h	10	0,565	0,593	0,574	5,42
kontrola po 4 h	10	0,639	0,594	0,616	5,87
2-h izpost. 2,5 mM Fe(III)	neredčen	0,668	0,669	0,668	0,64
4-h izpost. 2,5 mM Fe(III)	neredčen	0,578	0,571	0,574	0,54
2-h izpost. 10 mM Cr(III)	5	0,950	0,923	0,936	4,65
4-h izpost. 10 mM Cr (III)	5	0,628	0,620	0,624	3,00
2-h izpost. komb. obeh ionov	neredčen	0,900	0,894	0,897	0,89
4-h izpost. komb. obeh ionov	neredčen	0,604	0,598	0,601	0,57

Priloga C2: Rezultati druge neodvisne meritve absorbance pri 595 nm in določitev koncentracije proteinov (g/l) posameznih vzorcev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155. Obrazložitev kratic: kontrola po 2 h in 4 h kultivacije od sredine eksponentne faze rasti; 2-h ali 4-h izpostavitve določenim kovinskim ionom.

vzorec	2. meritev				
	faktor redčitve	paralelka A (A ₅₉₅ nm)	paralelka B (A ₅₉₅ nm)	povprečje (A ₅₉₅ nm)	konc. proteinov (g/l)
kontrola po 2 h	10	0,733	0,649	0,691	6,7
kontrola po 4 h	10	0,562	0,557	0,559	5,2
2-h izpost. 2,5 mM Fe(III)	neredčen	1,007	0,993	1,000	1,00
4-h izpost. 2,5 mM Fe(III)	neredčen	0,990	1,002	0,996	0,99
2-h izpost. 10 mM Cr(III)	5	1,066	1,101	1,08	5,45
4-h izpost. 10 mM Cr (III)	5	1,09	1,10	1,10	5,55