

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Teja ZAKRAJŠEK

**VPLIV EKSOGENIH ANTIOKSIDANTOV NA
ENDOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI
SISTEM PRI KVASOVKI *Saccharomyces cerevisiae***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Teja ZAKRAJŠEK

**VPLIV EKSOGENIH ANTIOKSIDANTOV NA ENDOGENI
ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM PRI KVASOVKI**
Saccharomyces cerevisiae

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF EXOGENOUS ANTIOXIDANTS ON ENDOGENOUS
ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM IN YEAST**
Saccharomyces cerevisiae

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Staršem in v ljubeč spomin na staro mamo.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 07. 12. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Polona Jamnik.

Doktorska naloga je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Mentorica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Samo KREFT
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorandka:
Teja ZAKRAJŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDC 602.3:582.282.23:579.22/.26:577.1(043)=163.6
KG	kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /modelni organizem/fiziologija kvasovk/ekologija kvasovk/antioksidanti/endogeni antioksidativni obrambni sistemi/eksogeni antioksidanti/oksidativni stres/proteomika
AV	ZAKRAJŠEK, Teja, univ. dipl. mikr.
SA	JAMNIK, Polona (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI	2014
IN	VPLIV EKSOGENIH ANTIOKSIDANTOV NA ENDOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM PRI KVASOVKI <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 160 str., 32 pregl., 35 sl., 409 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Eksogeni antioksidanti lahko porušijo redoks ravnotežje v celicah, ki je ključnega pomena za vzdrževanje homeostaze oziroma optimalno funkcionalnost celic. Vpliv eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne obrambne sisteme smo preučevali na kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v stacionarni fazi rasti, ki ustreza fazi mirovanja, v kateri večino življenja preživi večina evkariontskih celic. Celice smo najprej 4 oziroma 24 ur tretirali z askorbinsko kislino ali kvercetinom, temu je sledila izpostavitvev induktorju oksidativnega stresa (menadion). Vpliv predtretiranja z antioksidanti kot tudi naknadne izpostavitve menadionu smo na celični ravni preverili z merjenjem znotrajcelične oksidacije, celične energijske metabolne aktivnosti in kultivabilnosti ter na molekularni ravni z merjenjem aktivnosti nekaterih encimskih endogenih antioksidativnih sistemov (superoksid dismutaza, proteasom), vsebnosti neencimskih endogenih sistemov (glutation), nivojem oksidativnih poškodb proteinov in splošno spremembo v proteinskem profilu z uporabo 2-D elektroforeze. Delovanje askorbinske kisline ali kvercetina v celicah ni neodvisno, temveč se močno prepleta z delovanjem primarnih in sekundarnih endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov in je specifično za posamezen antioksidant. Način delovanja (antioksidativno ali prooksidativno) askorbinske kisline in kvercetina je odvisen od koncentracije, časa delovanja in aktivnosti endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov. Predtretiranje s kvercetinom je v primerjavi z askorbinsko kislino bolj učinkovito v zaščiti celic pred induktorjem oksidativnega stresa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
 DC UDC 602.3:582.282.23:579.22/.26:577.1(043)=163.6
 CX yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/model organisms/yeast physiology/yeast ecology/antioxidants/endogenous antioxidative defense systems/exogenous antioxidants/oxidative stress/proteomics
 AU ZAKRAJŠEK, Teja
 AA JAMNIK, Polona (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, field Biotechnology
 PY 2014
 TI INFLUENCE OF EXOGENOUS ANTIOXIDANTS ON ENDOGENOUS ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM IN YEAST *Saccharomyces cerevisiae*
 DT Doctoral Dissertation
 NO XV, 160 p., 32 tab., 35 fig., 409 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Exogenous antioxidants can disrupt cell redox balance, which is crucial for homeostasis maintaining and optimal cellular functioning. Influence of exogenous antioxidant on endogenous antioxidative defense systems was investigated in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast stationary phase corresponds to quiescent state in which mostly all of eukaryotic cells spend great part of their natural lives. Cells were treated with ascorbic acid or quercetin for 4 and 24 h and then exposed to inductor of oxidative stress (menadione). Influence of antioxidant pretreatment and subsequent application of stress inductor was analyzed at cellular level by measuring intracellular oxidation, cell energy metabolic activity and cultivability as colony forming units and at molecular level by measuring the activity of some enzymatic endogenous antioxidative defense systems (superoxide dismutase, proteasome), level of nonenzymatic endogenous antioxidative defense systems (glutathione), level of carbonyls and changes in yeast protein profile using 2-D electrophoresis. Quercetin and ascorbic acid do not act independently. Their effect is dependent on primary and secondary antioxidative defense systems and is specific for particular antioxidant. The mode of action (prooxidative or antioxidative) of quercetin and ascorbic acid depends on concentration, time of action and primary and secondary antioxidative defense systems activity. Pretreatment with quercetin compared to pretreatment with ascorbic acid is much more protective against subsequent application of stress inductor.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OKSIDATIVNI STRES	4
2.2 NASTANEK REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI	4
2.3 REAKTIVNE KISI KOVE ZVRSTI	7
2.3.1 Primarne reaktivne kisikove zvrsti	9
2.3.1.1 Superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$)	9
2.3.1.2 Vodikov peroksid (H_2O_2)	9
2.3.1.3 Hidroksilni radikal ($\cdot OH$)	10
2.4 POŠKODBE CELIČNIH KOMPONENT	11
2.4.1 Lipidna peroksidacija	11
2.4.2 Oksidativne poškodbe DNA	13
2.4.3 Oksidativne poškodbe proteinov	13
2.5 ENDOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI	15
2.5.1 Primarni encimski antioksidativni obrambni sistemi	16
2.5.1.1 Superoksid dismutaza	17
2.5.1.2 Katalaza	17
2.5.1.3 Peroksidaza	18
2.5.2 Primarni neencimski antioksidativni obrambni sistemi	18
2.5.3 Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi	19
2.5.3.1 Popravilo reverzibilno poškodovanih proteinov	20
2.5.3.1.1 Tioredoksinski sistem	21
2.5.3.1.2 Glutaredoksinski sistem	21
2.5.3.1.3 Msr sistem	22
2.5.3.2 Proteoliza	22
2.5.3.2.1 Specifična proteoliza	22
2.5.3.2.2 Nespecifična proteoliza	23
2.6 EKSOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM	24
2.6.1 Kvercetin	24

2.6.2	Askorbinska kislina	26
2.7	KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM	28
2.7.1	Prednosti kvasovke <i>S. cerevisiae</i> kot modelnega organizma	28
2.7.2	Kvasovka <i>S. cerevisiae</i> v stacionarni fazi rasti kot modelni organizem	29
3	MATERIALI IN METODE	30
3.1	POTEK DELA	30
3.2	MATERIALI	31
3.2.1	Mikroorganizem	31
3.2.2	Gojišča	31
3.2.2.1	Trdno gojišče YEPD	31
3.2.2.2	Tekoče gojišče YEPD	31
3.2.3	Raztopine in reagenti	32
3.2.3.1	Inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	32
3.2.3.2	Izpostavitev celic kvasovk antioksidantom	32
3.2.3.3	Izpostavitev celic kvasovk induktorju oksidativnega stresa	33
3.2.3.4	Določanje živosti kvasovk	33
3.2.3.4.1	Določanje živosti preko integritete membrane	33
3.2.3.4.2	Določanje živosti s štetjem CFU (colony forming units)	34
3.2.3.5	Ocena znotrajcelične oksidacije	34
3.2.3.6	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti	35
3.2.3.7	Priprava celičnega ekstrakta kvasovk	35
3.2.3.7.1	Celični ekstrakt za merjenje aktivnosti totalne superoksid dismutaze	35
3.2.3.7.2	Celični ekstrakt za merjenje aktivnosti proteasoma	35
3.2.3.8	Določanje aktivnosti superoksid dismutaze	36
3.2.3.9	Določanje aktivnosti proteasoma	36
3.2.3.10	Določanje vsebnosti glutationa	37
3.2.3.11	Ekstrakcija celokupnih proteinov	38
3.2.3.12	Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov	38
3.2.3.13	Priprava ekstraktov za detekcijo oksidativnih poškodb na poliakrilamidnem gelu	38
3.2.3.14	Določanje proteinov	39
3.2.3.14.1	Določanje vsebnosti skupnih proteinov v biomasi	39
3.2.3.14.2	Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu	39
3.2.3.15	2-D elektroforeza	40
3.2.3.15.1	Izoelektrično fokusiranje (IEF)-prva dimenzija	40
3.2.3.15.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)	40
3.2.3.15.3	Barvanje gelov	43
3.2.4	Laboratorijska oprema	43
3.2.4.1	Priprava gojišč, raztopin in reagentov	43
3.2.4.2	Inokulacija, kultivacija in inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	43
3.2.4.3	Pridobitev biomase (vzorcev) za analize	44
3.2.4.4	Določanje živosti kvasovk	44
3.2.4.5	Ocena znotrajcelične oksidacije	45

3.2.4.6	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti	45
3.2.4.7	Priprava celičnega ekstrakta kvasovk	45
3.2.4.8	Določanje aktivnosti superoksid dismutaze	45
3.2.4.9	Določanje aktivnosti proteasoma	46
3.2.4.10	Določanje vsebnosti glutationa	46
3.2.4.11	Ekstrakcija proteinov	46
3.2.4.12	Določanje proteinov	47
3.2.4.13	2-D elektroforeza	47
3.2.4.14	Detekcija slike in analiza gelov	48
3.2.4.15	Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje vzorcev, raztopin, reagentov in kompletov	48
3.3	METODE	49
3.3.1	Priprava kulture kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v stacionarni fazi rasti	49
3.3.1.1	Inokulacija in kultivacija	49
3.3.1.2	Prenos kulture v pufer PBS	49
3.3.2	Tretiranje kulture v stacionarni fazi rasti	49
3.3.2.1	Izpostavitve celic eksogenim antioksidantom	50
3.3.2.2	Izpostavitve celic eksogenim antioksidantom ter induktorju oksidativnega stresa	50
3.3.3	Ocena znotrajcelične oksidacije	51
3.3.4	Določanje živosti kvasovk	52
3.3.4.1	Določanje živosti preko integritete membrane	52
3.3.4.2	Določanje kultivabilnosti	53
3.3.5	Merjenje celične energijske metabolne aktivnosti	53
3.3.6	Priprava celičnega ekstrakta kvasovk za določanje aktivnosti encimov	54
3.3.6.1	Priprava celičnega ekstrakta za določanje aktivnosti proteasoma	54
3.3.6.2	Priprava celičnega ekstrakta za določanje aktivnosti superoksid dismutaze	54
3.3.7	Določanje aktivnosti superoksid dismutaze	55
3.3.8	Določanje aktivnosti proteasoma	56
3.3.9	Določanje vsebnosti glutationa	58
3.3.10	Ekstrakcija celokupnih proteinov	60
3.3.11	Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov	61
3.3.12	Določanje proteinov	61
3.3.12.1	Določanje vsebnosti celokupnih proteinov v biomasi	61
3.3.12.2	Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu	62
3.3.13	Dvodimenzionalna elektroforeza (2-D PAGE)	63
3.3.13.1	Prva dimenzija (izoelektrično fokusiranje)	63
3.3.13.1.1	Priprava ekstraktov za določanje oksidativnih poškodb proteinov	63
3.3.13.1.2	Priprava ekstraktov za nanos na IPG trakove	64
3.3.13.1.3	Rehidracija IPG trakov	64
3.3.13.1.4	Izoelektrično fokusiranje (IEF)	64
3.3.13.2	Druga dimenzija (SDS poliakrilamidna elektroforeza)	65

3.3.13.2.1	Vlivanje poliakrilamidnih gelov	65
3.3.13.2.2	Uravnoveženje IPG trakov	66
3.3.13.2.3	Prenos IPG trakov na ločevalni gel	67
3.3.13.2.4	SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)	67
3.3.13.3	Detekcija oksidativno poškodovanih proteinov	67
3.3.13.4	Barvanje gelov	68
3.3.13.5	Slikanje gelov	69
3.3.13.5.1	Alexa Fluor® 488 hydroxylamine	69
3.3.13.5.2	Sypro Ruby	70
3.3.13.6	Analiza slik	70
3.3.13.7	Identifikacija proteinov	70
3.3.14	Statistična analiza rezultatov	71
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	72
4.1	KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> V STACIONARNI FAZI RASTI KOT MODELNI ORGANIZEM	72
4.1.1	Okarakterizacija kvasovke v stacionarni fazi rasti na celični ravni	73
4.1.2	Okarakterizacija kvasovke v stacionarni fazi rasti na ravni proteoma	80
4.2	VPLIV EKSOGENIH ANTIOKSIDANTOV NA ENDOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM	86
4.2.1	Kultivabilnost	86
4.2.2	Znotrajcelična oksidacija in celična energijska metabolna aktivnost	90
4.2.3	Merjenje vsebnosti glutationa	97
4.2.4	Aktivnost superoksid dismutaze	101
4.2.5	Aktivnost proteasoma	105
4.2.6	Analiza proteoma	109
4.2.6.1	Oksidativne poškodbe proteinov	109
4.2.6.2	Proteinski profil kulture	112
4.3	ZAKLJUČNA DISKUSIJA S HIPOTEZAMI	115
4.4	SKLEPI	118
5	POVZETEK (SUMMARY)	120
5.1	POVZETEK	120
5.2	SUMMARY	121
6	VIRI	123
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Reaktivne kisikove zvrsti (Halliwell in Gutteridge, 2007).	7
Preglednica 2: Primarni antioksidativni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Walker, 1998).	16
Preglednica 3: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993).	31
Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993).	31
Preglednica 5: Sestava pufra PBS.	32
Preglednica 6: Priprava 1 M založne raztopine askorbinske kisline.	32
Preglednica 7: Priprava 5 mM založne raztopine kvercetina.	32
Preglednica 8: Priprava 80 % etanola.	33
Preglednica 9: Priprava 1M založne raztopine menadiona.	33
Preglednica 10: Priprava 50 mM K ₂ HPO ₄ .	34
Preglednica 11: Priprava 50 mM KH ₂ PO ₄ .	34
Preglednica 12: Sestavine za pripravo 1 mM založne raztopine H ₂ DCFDA.	34
Preglednica 13: Sestavine za pripravo ekstrakcijskega pufra (EP).	38
Preglednica 14: Priprava 2,5 % CuSO ₄ x 5H ₂ O.	39
Preglednica 15: Priprava 3 M NaOH.	39
Preglednica 16: Sestavine za pripravo 0,15 M NaCl.	39
Preglednica 17: Sestavine za pripravo rehidracijskega pufra (RP).	40
Preglednica 18: Sestavine za pripravo osnovnega pufra za uravnoteženje.	40
Preglednica 19: Priprava 5x SDS elektroforeznega pufra.	41
Preglednica 20: Priprava 1x SDS elektroforeznega pufra.	41
Preglednica 21: Priprava 1,5 M raztopine Tris-HCl (pH = 8,8).	41
Preglednica 22: Priprava 10 % (w/v) raztopine SDS.	42
Preglednica 23: Priprava 10 % (w/v) raztopine APS.	42
Preglednica 24: Priprava ločevalnega gela debeline 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida.	42
Preglednica 25: Sestavine za pripravo 0,5 % agarozne raztopine.	42
Preglednica 26: Sestavine za pripravo fiksacijske raztopine.	43
Preglednica 27: Sestavine za pripravo raztopine za razbarvanje.	43
Preglednica 28: Raztopine, uporabljene za tretiranje kulture v stacionarni fazi rasti.	50
Preglednica 29: Protokol določanja aktivnosti superoksid dismutaze.	56
Preglednica 30: Protokol določanja aktivnosti proteasoma.	57
Preglednica 31: Protokol določanja glutationa.	60
Preglednica 32: Postopek barvanja gelov.	69

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema respiratorne verige <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mesta nastanka ROS ter glavni encimi (Herrero in sod., 2008).	6
Slika 2: Stopnje lipidne peroksidacije (Mimica-Dukić in sod., 2012).	12
Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov (Pistelli in Giorgi, 2012).	25
Slika 4: Molekulska struktura kvercetina (Chen, 2010).	26
Slika 5: Struktura askorbinske kisline (Vertuani in sod., 2004).	27
Slika 6: Shema poteka dela	30
Slika 7: Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tekom kultivacije v gojišču YEPD.	74
Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tekom kultivacije v gojišču YEPD.	74
Slika 9: Živost celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tekom kultivacije v gojišču YEPD.	75
Slika 10: Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> med inkubacijo v pufru PBS.	76
Slika 11: Živost celic merjena preko integritete celične membrane kvasovk <i>S. cerevisiae</i> tekom inkubacije v pufru PBS s prikazanima platojema 1 in 2.	77
Slika 12: Kultivabilnost celic merjena preko CFU kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tekom inkubacije v pufru PBS s prikazanima platojema 1 in 2.	78
Slika 13: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>S. cerevisiae</i> tekom inkubacije v pufru PBS s prikazanima platojema 1 in 2.	79
Slika 14: Reprezentativni 2-D proteinski profili ekstraktov kvasovk ob določenih časih inkubacije kvasovke <i>S. cerevisiae</i> v pufru PBS.	81
Slika 15: Reprezentativni 2-D proteinski profili ekstraktov kvasovk ob določenih časih inkubacije kvasovke <i>S. cerevisiae</i> v pufru PBS.	82
Slika 16: Relativne spremembe v zastopanosti izbranih metabolnih proteinov ob določenih časih inkubacije.	83
Slika 17: Relativne spremembe v zastopanosti izbranih antioksidativnih proteinov ob določenih časih inkubacije.	84
Slika 18: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na kultivabilnost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> 4 oz. 24 ur po dodatku.	88
Slika 19: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-manadionu (M) na kultivabilnost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	90
Slika 20: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na nivo znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>S. cerevisiae</i> 4 oz. 24 ur po dodatku.	92
Slika 21: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na nivo znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	94

Slika 22:	Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na energijsko metabolno aktivnost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> 4 oz. 24 ur po dodatku.	95
Slika 23:	Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na energijsko metabolno aktivnost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	96
Slika 24:	Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na vsebnost reducirane oblike glutationa kvasovke <i>S. cerevisiae</i> 4 oz. 24 ur po dodatku.	98
Slika 25:	Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na vsebnost reducirane oblike glutationa kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	100
Slika 26:	Vpliv kvercetina in askorbinske kisline na aktivnost superoksid dismutaze kvasovke <i>S. cerevisiae</i> 4 oz. 24 ur po dodatku.	102
Slika 27:	Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost superoksid dismutaze kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	104
Slika 28:	Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na aktivnost proteasoma kvasovke <i>S. cerevisiae</i> 4 oz. 24 ur po dodatku.	106
Slika 29:	Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost proteasoma kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .	107
Slika 30:	Reprezentativni 2-D profili karbonilov kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . Profil karbonilov kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti (A) oziroma je bila predhodno tretirana 4 ure s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).	110
Slika 31:	Reprezentativni 2-D profili karbonilov kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . Profil karbonilov kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti (A) oziroma je bila predhodno tretirana 24 ur s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).	111
Slika 32:	Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i> , ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 4 ure predtretirana s kvercetinom.	113
Slika 33:	Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i> , ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 4 ure predtretirana z askorbinsko kislino.	113
Slika 34:	Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i> , ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 24 ur predtretirana s kvercetinom.	113
Slika 35:	Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i> , ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 24 ur predtretirana z askorbinsko kislino.	114

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje količine glutationa v reducirani obliki

Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije skupnih proteinov v biomasi kvasovke *S. cerevisiae* (metoda po Sticklandu)

Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu kvasovke *S. cerevisiae* (metoda po Bradfordu)

Priloga E: Proteinska mapa celokupnih proteinov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155

Priloga F: Pregled izmerjenih absolutnih vrednosti luminiscenčne intenzitete (LI) za določanje celične metabolne energijske aktivnosti, fluorescenčne intenzitete (FI) za oceno znotrajcelične oksidacije in določanje živosti preko integritete membrane ter A_{650} za določanje optične gostote tekom kultivacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 v gojišču YEPD

Priloga G: Meritve luminiscenčne intenzitete (LI) za določanje celične metabolne energijske aktivnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

Priloga H: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za oceno znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

Priloga I: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje živosti preko integritete membran kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

Priloga J: Meritve CFU/mL za določanje kultivabilnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

Priloga K: Meritve luminiscenčne intenzitete (LI) za določanje celične energijske metabolne aktivnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga L: Meritve CFU/mL za določanje kultivabilnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga M: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po tretiranju z askorbinsko kislino

Priloga N: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po tretiranju s kvercetinom

Priloga O: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po 4-urnem predtretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga P: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po 24-urnem predtretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga Q: Vsebnost glutationa v reducirani obliki v biomasi kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga R: Specifična aktivnost superoksid dismutaze v celičnem ekstraktu kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga S: Specifična aktivnost proteasoma v celičnem ekstraktu kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

Priloga T: Reprezentativni 2-D proteinski profili kulture kvasovke *S. cerevisiae*. (A) Proteinski profil kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti oziroma je bila predhodno tretirana 4 ure s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).

Priloga U: Reprezentativni 2-D proteinski profili kulture kvasovke *S. cerevisiae*. (A) Proteinski profil kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti oziroma je bila predhodno tretirana 24 ur s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{λ}	absorbanca pri ustrezni valovni dolžini (λ)
AK	askorbinska kislina
AMC	7-amido-4-metilkumarin (ang. 7-amido 4-methylcoumarin)
APS	amonijev persulfat
ATP	adenosin trifosfat
BFM	bromfenol modro
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
CFU	število kolonijskih enot (ang. colony forming units)
CHAPS	3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propan-sulfonat (ang. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CP	citosolni ekstrakcijski pufer
CuSO_4	bakrov sulfat
Cu/Zn SOD	baker in cink vsebujoča superoksid dismutaza
Da	dalton ($1,66 \times 10^{-24}$ g)
dH_2O	destilirana voda
ddH_2O	bidestilirana voda
DCF	diklorofluorescein (ang. dichlorofluorescein)
DMSO	dimetil sulfoksid (ang. dimethyl sulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
DTT	ditiotreitol (ang. dithiotreitol)
FRET	fluorescenčni resonančni prenos energije (ang. fluorescence resonance energy transfer)
GSH	reducirana oblika glutationa
GSSG	oksidirana oblika glutationa
H_2DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein)
H_2DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (angl. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
IEF	izoelektrično fokusiranje (ang. isoelectric focusing)
IP	inhibitor proteaz
IPG	imobiliziran pH gradient
KCl	kalijev klorid
K_2HPO_4	dikalijev hidrogenfosfat
KH_2PO_4	kalijev dihidrogenfosfat
M	menadion
mA	miliamper
MG-132	specifični inhibitor proteasoma
MNA	4-metoksi-2-naftilamin
Mr	relativna molekulska masa
KOH	kalijev hidroksid
MP	mitohondrijski ekstrakcijski pufer
NA	2-naftilamin
NaCl	natrijev klorid
Na_2HPO_4	dinatrijev hidrogenfosfat
NaOH	natrijev hidroksid
obr./min	obrati na minuto

OD	optična gostota (ang. optical density)
OPA	o-ftalaldehid (ang. o-phthalaldehyde)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate buffered saline)
PCA	perklorna kislina (ang. perchloric acid)
pI	izoelektrična točka
PJ	propidijev jodid
Q	kvercetin
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (ang. sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis)
se	standardna napaka (ang. standard error)
TCA	trikloroacetna kislina (ang. trichloroacetic acid)
TEMED	tetrametiletilendiamin (ang. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
Tris HCl	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, vodikov klorid
v/v	mL/100 mL
W	vat (ang. watt)
WST-1	vodotopna tetrazolijeva sol (ang. water-soluble tetrazolium salt)
w/v	g/100 mL
YEPD	gojišče s kvasnim ekstraktom, peptonom in dekstrozo (ang. yeast extract peptone dextrose growth medium)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov, BF, Ljubljana
2-D PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamidna gelska elektroforeza

1 UVOD

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so različne molekule kisika, v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom (Sigler in sod., 1999). Najpomembnejše ROS v celici so radikali (superoksidni anion, $O_2^{\bullet-}$; hidroksilni radikal, $\bullet OH$; alkoksilni radikal, $RO\bullet$; radikal dušikovega oksida, $NO\bullet$; alkilperoksilni radikal, $ROO\bullet$; hidroperoksilni radikal, $HOO\bullet$), singletni kisik (1O_2) ter vodikov peroksid (H_2O_2). ROS so rezultat normalnega celičnega metabolizma, posledica dejavnikov okolja (γ -žarčenje, žarčenja valovnih dolžin blizu UV spektra, toplote,...) ter nekaterih zdravil (Imlay in Linn, 1988; Korošec, 2000).

ROS (predvsem superoksidni anion, hidroksilni radikal, vodikov peroksid in singlet kisik) povzročajo poškodbe celic z oksidacijo lipidov, proteinov in nukleinskih kislin (Halliwell, 1996). Reaktivne kisikove zvrsti so v nizkih koncentracijah ugodne za normalno fiziološko delovanje celic, medtem ko so v visokih koncentracijah škodljive (Elahi in sod., 2009; Grune, 2002; Martin in Barrett, 2002; Valko in sod., 2007).

V določenih stresnih pogojih se poveča količina ROS, ki je antioksidativni obrambni sistemi ne morejo znižati in zato pride do oksidativnega stresa. Oksidativni stres torej nastopi v primeru, ko je presežena učinkovitost endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov, zaradi napak obrambnega sistema (npr. v primeru mutacij) ali povečanega nastanka ROS (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Antioksidanti oksidativni stres preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravirom oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000). Antioksidant je snov, ki opazno zadrži ali prepreči oksidacijo neke druge snovi tudi takrat, ko je koncentracija le-te precej večja od koncentracije antioksidanta (Halliwell in Gutteridge, 2000). Razlikujejo se po kemijski strukturi kakor tudi po mehanizmu delovanja, zato jih lahko delimo po različnih kriterijih (izvoru, načinu delovanja, strukturi kemijsko fizikalnih lastnosti in mehanizmu delovanja). Glede na fizikalno kemijske lastnosti jih delimo na polarne oziroma vodotopne (npr. askorbinska kislina, glutathion, flavonoidi) in nepolarne oz. lipofilne (tokoferoli in karotenoidi) (Vertuani in sod., 2004).

Lahko so endogenega ali eksogenega izvora. Endogene antioksidativne obrambne sisteme delimo na primarne, ki preprečijo začetne in/ali propagacijske reakcije radikalov/oksidantov s celičnimi komponentami ter sekundarne, ki popravljajo poškodbe v celici, povzročene z ROS (Costa in Moradas-Ferreira, 2001; Davies, 1986). Antioksidante, ki so del endogenega antioksidativnega sistema (npr. superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza in glutathion) organizmi sintetizirajo sami, medtem ko antioksidante eksogenega izvora (npr. vitamini) dobijo z živili ali prehranskimi dopolnili (Bouayed in Bohn, 2010; Ratnam in sod., 2006; Biehler in Bohn, 2010; André in sod., 2010; Kreft in sod., 2000). Številne študije navajajo, da bi lahko z uporabo eksogenih antioksidantov

preprečevali nastanek oksidativnega stresa in z njim povezanih bolezni. Čeprav je bilo za mnoge učinkovine iz živil ali prehranskih dopolnil z *in vitro* metodami dokazano, da so učinkoviti antioksidanti, pa je učinkovitost le teh v celicah in organizmih lahko povsem drugačna, ker je odvisna od njihove permeabilnosti, metabolizma ter stranskih učinkov produktov njihove reakcije z oksidanti (Bast in Haenen, 2002; Boots in sod., 2007). Eksogeni antioksidanti lahko porušijo redoks ravnotežje v celicah, ki je ključnega pomena za vzdrževanje homeostaze oziroma optimalno funkcionalnost celic (Bouayed in Bohn, 2010).

Za študij različnih vidikov oksidativnega stresa na biokemijski, molekularno biološki in celični ravni so mikroorganizmi primerni modeli, kajti oksidativne poškodbe nukleinskih kislin, lipidov, proteinov in drugih celičnih komponent ter principi celične obrambe proti oksidativnemu stresu (encimi, udeleženi pri zmanjševanju količine ROS, popravilo poškodovanih makromolekul, odstranjevanje nepopravljivih proteinov) so v osnovi podobni pri vseh organizmih (Sigler in sod., 1999). Kvasovka *S. cerevisiae* se kot modelni mikroorganizem uporablja za študij osnovnih celičnih procesov, stresnih odgovorov in metabolnih poti človeka (Ma, 2001; Menacho-Márquez in Margaña, 2007). *S. cerevisiae* ima kar nekaj lastnosti zaradi katerih je uporabna in cenjena kot modelni mikroorganizem: ima kratek podvojevalni čas (90 min), raste na enostavnih, cenjenih tekočih in trdnih gojiščih (Simon in Bedalov, 2004), njeno vzdrževanje je poceni in enostavno (Menacho-Márquez in Margaña, 2007).

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorskega dela je bil preučiti vpliv eksogenih antioksidantov na endogeni antioksidativni obrambni sistem pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* kot modelnem organizmu.

V ta namen smo okarakterizirali kvasovko *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti na celičnem in proteomskem nivoju ter preučili kdaj tekom stacionarne faze rasti je najprimernejša kot model. Poskušali smo ugotoviti, ali eksogeni antioksidanti pripomorejo k zaščiti pred oksidativnim stresom, kateri od uporabljenih antioksidantov (askorbinska kislina ali kvercetin) je boljši v zaščiti pred oksidativnim stresom ter na kakšen način vplivata na endogene antioksidativne obrambne sisteme. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je bila tretirana različen čas z različnima antioksidantoma in naknadno izpostavljena induktorju oksidativnega stresa. Vpliv smo preučevali tako na celičnem kot tudi molekularnem nivoju.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo sledeče hipoteze:

Hipoteza 1:

Predvidevamo, da tretiranje celic z antioksidanti, ki delujejo direktno kot lovilci radikalov, povzroči zmanjšanje ekspresije in/ali aktivnosti endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov in tako poveča občutljivost celic na induciran oksidativni stres.

Hipoteza 2:

Predvidevamo, da tretiranje celic z antioksidanti, ki delujejo indirektno z indukcijo endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov zmanjša občutljivost celic na induciran oksidativni stres.

Hipoteza 3:

Predvidevamo, da je antioksidativen učinek v celici – direktni ali indirektni povezan s časom izpostavitve celic antioksidantu.

Hipoteza 4:

Predvidevamo, da je vpliv hidrofilnega antioksidanta na endogeni antioksidativni obrambni sistem drugačen kot vpliv lipofilnega antioksidanta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je definiran kot porušenje ravnotežja med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) in antioksidanti v celici v prid ROS (Sies, 1991b). Za večino organizmov je kisik nujno potreben za življenje, hkrati pa je glavni povzročitelj poškodb in smrti (Jovanovic in Simic, 2000). Kvasovke so tako kot drugi aerobni organizmi stalno izpostavljene toksičnim stranskim učinkom molekularnega kisika, in sicer preko tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so stranski produkti normalnega celičnega metabolizma (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Da kisik povzroča toksične efekte preko tvorbe reaktivnih radikalov sta odkrila Gersham (1954) in Herman (1956) (Sohal in Allen, 1990).

Pri normalnih pogojih rasti so endogeni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da vzdržujejo ROS v dovolj nizki koncentraciji in popravljajo povzročene poškodbe v celici. Med endogene antioksidativne sisteme sodijo primarni obrambni sistemi, ki odstranjujejo ROS ter sekundarni, ki popravljajo molekularne poškodbe in odstranjujejo oksidirane molekule. V določenih stresnih pogojih se poveča količina ROS, ki je antioksidativni obrambni sistemi ne morejo znižati in zato pride do oksidativnega stresa. Oksidativni stres torej nastopi v primeru ko je presežena učinkovitost endogenih obrambnih sistemov (zmanjšana količina antioksidantov, sprememba obrambnega sistema npr. v primeru mutacij) ali povečanega nastanka ROS (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2 NASTANEK REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI

Reaktivne kisikove zvrsti nastajajo v normalnih celičnih metabolnih procesih ali pri izpostavitvi zunanjim vplivom oksidacije in jih glede na izvor delimo na endogene in eksogene (Abram, 2000; Batič in Raspor, 2000). Endogeni viri ROS v organizmih so mitohondrijska elektronska veriga, endoplazmatski retikulum, peroksisomi, celične in jedrne membrane ter fotosintetski sistem. Našteti viri so odgovorni za nastanek večjega dela ROS-običajno več kot 90 % (Starkov, 2008). Manjše količine ROS proizvajajo nekateri encimi, kot so NADPH oksidaze, lipoksigenaze, ciklooksigenaze in ksantin oksigenaze (Puddu in sod., 2008). Eksogeni viri ROS so UV in ionizirajoče sevanje, ozon ter razni povzročitelji, kot so cigaretni dim ter različni onesnaževalci (ksenobiotiki, organska topila in pesticidi) (Abram, 2000; Batič in Raspor, 2000).

Glavni intracelularni vir nastanka ROS je mitohondrijska elektronska veriga, ki porabi preko 90 % kisika v celici za produkcijo energije z oksidativno fosforilacijo (Lushchak, 2011). V elektronski transportni verigi se oksidira NADH, ki je produkt Krebsovega (TCA) cikla. V reakciji oksidacije se sproščajo elektroni, ki potujejo preko kompleksov

dihalne verige, (donorji in akceptorji elektronov), do kisika, ki se reducira v vodo. Med prenosom elektronov vzdolž dihalne verige se preko notranje mitohondrijske membrane tvori protonski gradient, ki se porabi za sintezo ATP (Brookes, 2005; Stevenson, 2012). Med normalno aerobno respiracijo pride do tetravalentne redukcije kisika v vodo (Herrero in sod., 2008). Intermediati tetravalentne redukcije so ROS, ki se tvorijo in sproščajo, če kisik ne sprejme vseh 4 elektronov in se le delno reducira (Jamieson, 1998; Manček in Pečar, 2001). V celici se delno reducira manj kot 5 % kisika (Lushchak in Semchyshyn, 2012).

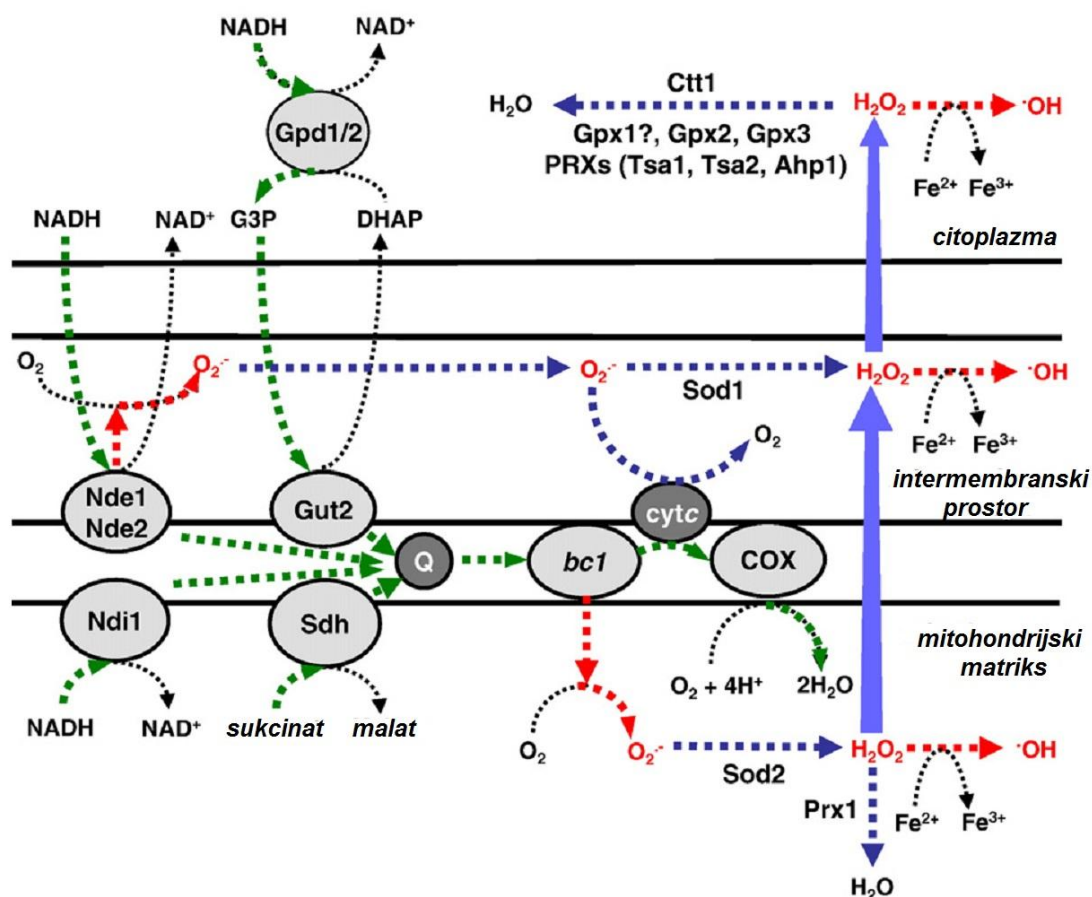
Glavne ROS, ki nastajajo pretežno v mitohondriju, so superoksidni anion, vodikov peroksid in hidroksilni radikal. Primarni ROS, ki se tvori v elektronski transportni verigi ter prekursor za ostale ROS je superoksidni anion, ki nastane s prenosom enega nesparjenega elektrona na molekularni kisik (Murphy, 2009).

Dihalno verigo višjih evkariontov tvori 5 proteinskih kompleksov v notranji mitohondrijski verigi, in sicer kompleks I (NADH-ubikinon oksidoreduktaza), kompleks II (sukcinat-ubikinon oksidoreduktaza), kompleks III (ubikonol-citokrom c oksidoreduktaza oz. citokrom bc1 kompleks), kompleks IV (citokrom c oksidaza) ter ATP sintaza (kompleks V). Glavni mesti nastanka superoksidnega aniona v mitohondrijih pri višjih evkariontih sta citokrom bc1 kompleks (kompleks III) in na rotenon občutljiva NADH:ubikinon oksidoreduktaza (kompleks I) (Turrens, 1997; Raha in Robinson, 2000; Barja, 1999). Količina ROS, nastalega na posameznih mestih dihalne verige še ni znana (Nohl in sod., 2003; Turrens, 2003; Halliwell in Whiteman, 2004).

Saccharomyces cerevisiae nima kompleksa I, temveč ima na rotenon neobčutljive NADH dehidrogenaze na notranji in zunanji strani notranje membrane mitohondrijev (Bakker in sod., 2001) (Slika 1). NADH:ubikinon oksidoreduktaza (interna NADH dehidrogenaza, Ndi 1), ki se nahaja na notranji strani notranje mitohondrijske membrane je pomembna za oksidacijo NADH, ki nastane v ciklu citronske kisline in pri oksidaciji etanola (Marres in sod., 1991).

Na zunanji strani notranje mitohondrijske membrane se nahajata tudi eksterni NADH dehidrogenazi (Nde1 in Nde2), katerih aktivno mesto je v intermembranskem prostoru mitohondrija. Ker je notranja mitohondrijska membrana neprepustna za NADH, nekateri predvidevajo, da sta Nde1 in Nde2 odgovorni za oksidacijo NADH, ki nastane v glikolizi (Overkamp in sod., 2000). Drugi raziskovalci so mnenja, da je primarna vloga eksternih NADH dehidrogenaz vpletenost v respiracijo med rastjo na etanolu (Davidson in Schiestl, 2001). Tako kot Ndi1 tudi Nde1 in Nde2 nista občutljivi na rotenon in ne črpata protonov (de Vries in Marres, 1987).

Zaradi prenosa elektronov z zunanje NADH dehidrogenaze na kisik nastane približno polovica superoksidnega aniona, pomemben vir nastanka druge polovice pa je citokrom bc1 kompleks. Nastanek velike količine superoksidnega aniona na mestu citokrom bc1 kompleksa je značilen tudi za višje evkarionte. NADH dehidrogenaza, ki je locirana na notranji strani notranje mitohondrijske membrane, naj ne bi bila vpletena v nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (Fang in Beattie, 2003).



Slika 1: Shema respiratorne verige *Saccharomyces cerevisiae*, mesta nastanka ROS ter glavni encimi (Herrero in sod., 2008).

bc1, citokrom bc1; cyt c, citokrom c; cox, citokrom c oksidaza; Ctt1, citosolna katalaza T; Gpd, citosolna NADH vezana glicerol-3-fosfat dehidrogenaza; Gpx, glutation peroksidaza; Gut 2, membransko vezana glicerol-3-fosfat:ubikinin oksidoreduktaza; Nde, eksterna NADH dehidrogenaza; Ndi1, interna NADH dehidrogenaza; Prx, peroksiredoksin; Q, ubikinin; Sdh, sukcinat dehidrogenazni kompleks; Sod, superoksid dismutaza

Figure 1: Schematic representation of the respiratory chain of *Saccharomyces cerevisiae* including sites of ROS formation and the main enzymes involved (Herrero et al., 2008).

bc1, cytochrome bc1; cyt c, cytochrome c; cox, cytochrome c oxidase; Ctt1, cytosolic catalase T; Gpd, cytosolic NADH-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase; Gpx, glutathione peroxidase; Gut 2, membrane bound glycerol-3-phosphate:ubiquinone oxidoreductase; Nde, external NADH dehydrogenase; Ndi1, internal NADH dehydrogenase; Prx, peroxiredoxin; Q, ubiquinone; Sdh, succinate dehydrogenase complex; Sod, superoxide dismutase

Velika količina ROS nastane tudi ob prekinitvi toka elektronov s specifičnimi inhibitorji ali ob pomanjkanju ADP. Ob prekinitvi toka elektronov ostanejo prenašalci navzgor od mesta blokade reducirani in nastanek ROS se poveča (Turrens, 2003; Raha in Robinson, 2000). Tako se v kvasovkah ob dodatku antimicina A, ki je inhibitor citokrom bc1 kompleksa, poveča nastanek vodikovega peroksida (Fang in Beattie, 2003).

Nastanek ROS se poveča tudi v prisotnosti ksenobiotikov, ki sprejemajo elektrone od elektronskih prenašalcev ter jih prenašajo na molekularni kisik ter tako povzročajo nastanek superoksidnega aniona brez inhibicije respiratorne verige (Halliwell in Gutteridge, 2007).

Reaktivne kisikove zvrsti nastajajo tudi v peroksisomih, ki so pomembni za metabolizem maščobnih kislin, n-alkanov, D-aminokislin ter metanola (Purdue in Lazarow, 2001). Mnogi encimi (npr. acil-CoA oksidaza, ki sodeluje v razgradnji maščobnih kislin v procesu beta-oksidacije) povzročajo predvsem nastanek vodikovega peroksida (Filipits in sod., 1993).

2.3 REAKTIVNE KISI KOVE ZVRSTI

Pojem reaktivne kisikove zvrsti (ROS) zajema kisikove proste radikale ter nekatere neradikalne derivate kisika kot sta na primer vodikov peroksid in ozon (Preglednica 1). Prosti radikali so atomi ali molekule z vsaj enim neparnim elektronom. So nestabilni in zelo reaktivni (Halliwell in Gutteridge, 2007).

Preglednica 1: Reaktivne kisikove zvrsti (Halliwell in Gutteridge, 2007).

Table 1: Reactive oxygen species (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Radikali	Neradikalni derivat
superoksid, $O_2^{\bullet -}$	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	peroksinitrit, $ONOO^-$
hidroksil, $\bullet OH$	peroksidušikova kislina, $ONOOH$
peroksil, $RO_2^{\bullet}$	nitrozoperoksikarbonat, $ONOOCO_2^-$
alkoksil, $RO^{\bullet}$	hipoklorna kislina, $HOCl$
karbonat, $CO_3^{\bullet -}$	hipobromidna kislina, $HOBr$
ogljikov dioksid, $CO_2^{\bullet -}$	ozon, O_3
singletni kisik, $O_2^1\Sigma^+$	singletni kisik $^1\Delta g$

Molekularni kisik, ki se nahaja v našem ozračju je tripletni kisik. Kljub temu, da ima v zadnji elektronski ovojnici dva nesparjena elektrona, je slabo reaktiven, saj imata elektrona enak oziroma paralelni spin (Lushchak in Semchyshyn, 2012). Zaradi paralelnih spinov mora kisik v oksidacijskih procesih pridobiti manjkajoča elektrona postopoma, ker lahko

reagira le z enim elektronom naenkrat. Izredno hitro pa reagira v prisotnosti reaktivnih molekul in radikalov. Reaktivnost molekule kisika se poveča, če eden od elektronov spremeni svoj spin in nastane singletni kisik ($^1\text{O}_2$), ki je močan oksidant (Sigler in sod., 1999; Herrero in sod., 2008).

Med normalno aerobno respiracijo se molekularni kisik reducira v vodo (enačba 5) v štirih korakih v katerih se prenese po en elektron. Med procesom tetravalentne redukcije nastanejo delno reducirani intermediati, ki so reaktivni: superoksidni anion ($\text{O}_2^{\bullet -}$) (enačba 1), vodikov peroksid (H_2O_2) (enačba 2) ter hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) (enačba 3). Produkt redukcije je najbolj reducirana oblika kisika, in sicer voda (enačba 4) (Halliwell in Gutteridge, 2007).



Skupaj:



Superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal in singletni kisik sodijo med primarne reaktivne kisikove zvrsti, ki reagirajo z nereaktivnimi celičnimi makromolekulami (DNA, lipidi in proteini) ter tvorijo sekundarne kisikove zvrsti (sekundarne ROS), kot so npr. alkoksilni in peroksilni radikali, epoksidi, hidroperoksidi in aldehidi. Tako se torej tvorijo novi radikali, ki povzročajo dodatne poškodbe celičnih membran, organelov in encimov daleč od mesta nastanka prvega radikala (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2007; Martínez-Cayuela, 1995). Mnoge sekundarne ROS so produkti lipidne peroksidacije ter oksidacije proteinov (Sies, 1986; Rikans in Hornbrook, 1997).

2.3.1 Primarne reaktivne kisikove zvrsti

Primarne reaktivne kisikove zvrsti nastajajo med procesom redukcije kisika v vodo (Halliwell in Gutteridge, 2007).

2.3.1.1 Superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$)

Superoksidni radikal nastane v prvi stopnji redukcije kisika in je prekurzor za nastanek večine ROS. Glavni vir nastanka superoksidnega aniona je elektronska transportna veriga (2 % kisika v celici se pretvori v $O_2^{\bullet -}$) (Chance in sod., 1979). Nastaja na zunanji mitohondrijski membrani, v matriksu ter na obeh straneh notranje membrane mitohondrija (Turrens, 2003). Za nastanek superoksidnega aniona so odgovorni tudi encimi, kot so flavoencimi (npr. ksantin oksidaza), lipoksigenaze in ciklooksigenaze (Kontos in sod., 1985; McIntyre in sod., 1999). Je šibka baza, katere mobilnost je zaradi negativnega naboja omejena. Je zmerno reaktiven za večino biomolekul, njegova razpolovna doba je približno 1 μ s. Ker ne prehaja preko lipidnih membran, je prisoten le v kompartmentu, v katerem je nastal. Hitra odstranitev superoksidnega aniona je za celico zelo pomembna, saj lahko v nasprotnem primeru povzroči nastanek visoko reaktivnih ROS, kot so vodikov peroksid, hidroksilni radikal ali singletni kisik. Kljub njegovi majhni reaktivnosti lahko povzroči inhibicijo nekaterih antioksidativnih encimov (glutation peroksidaze in delno tudi katalaze) ter encimov mitohondrijev (NADH dehidrogenaze, NADH oksidaze in ATP-aze). Zaradi reakcije s Fe-S centri v aktivnih mestih encimov (npr. akonitaze) povzroča inaktivacije encimov ter povečane količine prostega železa v celici, kar povzroča še dodatne poškodbe (Zhang in sod., 1990; Halliwell in Gutteridge, 2000).

2.3.1.2 Vodikov peroksid (H_2O_2)

Vodikov peroksid nastaja med normalnim celičnim metabolizmom ter z delovanjem superoksid dismutaze, ki katalizira pretvorbo superoksidnega aniona v kisik in vodikov peroksid. V kvasovkah vodikov peroksid nastaja tudi med oksidacijo maščobnih kislin v peroksisomih ter v endoplazmatskem retikulumu v procesu zvijanja proteinov (Halliwell in Gutteridge, 2007; Gross in sod., 2006; Tu in sod., 2000; Tu in Weissman, 2004). Vodikov peroksid ne sodi med proste radikale in je relativno nereaktiven. Zaradi relativno dolge razpolovne dobe (1 ms) in prehajanja preko membran, povzroča poškodbe tudi daleč stran od njegovega mesta nastanka (Bhattacharjee, 2005; Saran in Bors, 1991). Ima pomembno vlogo pri nastajanju zelo reaktivnega hipoklorita (HOCl) ter hidroksilnega radikala. Za odstranjevanje vodikovega peroksida so odgovorni trije antioksidativni encimski sistemi: katalaza, glutation peroksidaza in peroksiredoksin (Chae in sod., 1999a; Chae in sod., 1999b; Mates in sod., 1999). V sesalskih (Sundaresan in sod., 1995) in rastlinskih (Vergara

in sod., 2012) celicah ter kvasovkah (Bienert in sod., 2006; Bartosz, 2009) ima vodikov peroksid vlogo signalne molekule. H_2O_2 preko oksidacije na redoks občutljivih tiol peroksidaz (Fomenko in sod., 2011) aktivira transkripcijske faktorje, ki regulirajo izražanje antioksidativnih genov v kvasovkah (Wemmie in sod., 1997; Delaunay in sod., 2000; Delaunay in sod., 2002; Kuge in sod., 2001).

2.3.1.3 Hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksilni radikal je najbolj reaktiven kisikov radikal. Njegova razpolovna doba v vodnih raztopinah je 1 ns, zato reagira blizu mesta nastanka (Pastor in sod., 2000). Radikal nastane iz H_2O_2 v reakciji, ki jo katalizirajo kovinski ioni (Cu^+ in Fe^{2+}), ki se pogosto nahajajo v kompleksih s proteini in drugimi molekulami (Nordberg in Arnér, 2001). Ta reakcija je znana kot Fentonova reakcija:



Pri reciklaciji kovinskih ionov pomembno vlogo igra superoksidni radikal:



Reakcija je znana kot Haber-Weiss reakcija (Halliwell, 1999a; Halliwell, 1987). Pri nastanku hidroksilnega radikala torej pomembno vlogo igrajo kovinski ioni, ki se sproščajo iz proteinov, kot so feritin (Harris in sod., 1994) in železo-žveplovi (4Fe-4S) centri različnih dehidrataz (Fridovich, 1997), in sicer v reakciji s superoksidnim anionom. Obseg nastajanja hidroksilnega radikala je določen z razpoložljivostjo in lokacijo kovinskega iona (Aruoma, 1998). Hidroksilni radikal reagira z večino biomolekul in metabolitov, pri čemer se tvorijo novi radikali (Halliwell, 1995). Večino oksidativnih poškodb v celici povzroči hidroksilni radikal, ki je mnogo bolj toksičen, kot sta superoksidni anion in vodikov peroksid. Slednja dva sta pomembna predvsem zaradi težnje po tvorjenju $\cdot\text{OH}$ (Halliwell in Cross, 1994).

2.4 POŠKODBE CELIČNIH KOMPONENT

Glavne tarče primarnih reaktivnih kisikovih zvrsti so DNA, lipidi in proteini. Nezmožnost omejitve tovrstnih poškodb vodi v celično smrt (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.4.1 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je proces oksidativne razgradnje polinenasičenih maščobnih kislin lipidov, ki jo povzročajo reaktivne kisikove zvrsti (Mimica-Dukić in sod., 2012). Produkt lipidne peroksidacije so hidroperoksidi maščobnih kislin, ki so podvrženi fragmentaciji in tako nastanejo zelo reaktivne produkti, kot so epoksidi, aldehidi in alkani. Nekateri od teh produktov prispevajo k naraščanju števila prostih radikalov ter povzročajo poškodbe DNA in proteinov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Nenasičene maščobne kisline so bolj občutljive na peroksidacijo kot nasičene. Dovzetnost polinenasičenih maščobnih kislin za peroksidacijo narašča z večanjem števila dvojnih vezi v lipidni verigi (Nagaoka in sod., 1990). Peroksidacija membranskih lipidov negativno vpliva na funkcijo membran, zmanjša fluidnost membran, inaktivira membransko vezane receptorje in encime, poveča permeabilnost membrane za ione ter sčasoma povzroči porušenje membrane (Gutteridge in Halliwell, 1990; Gutteridge, 1995).

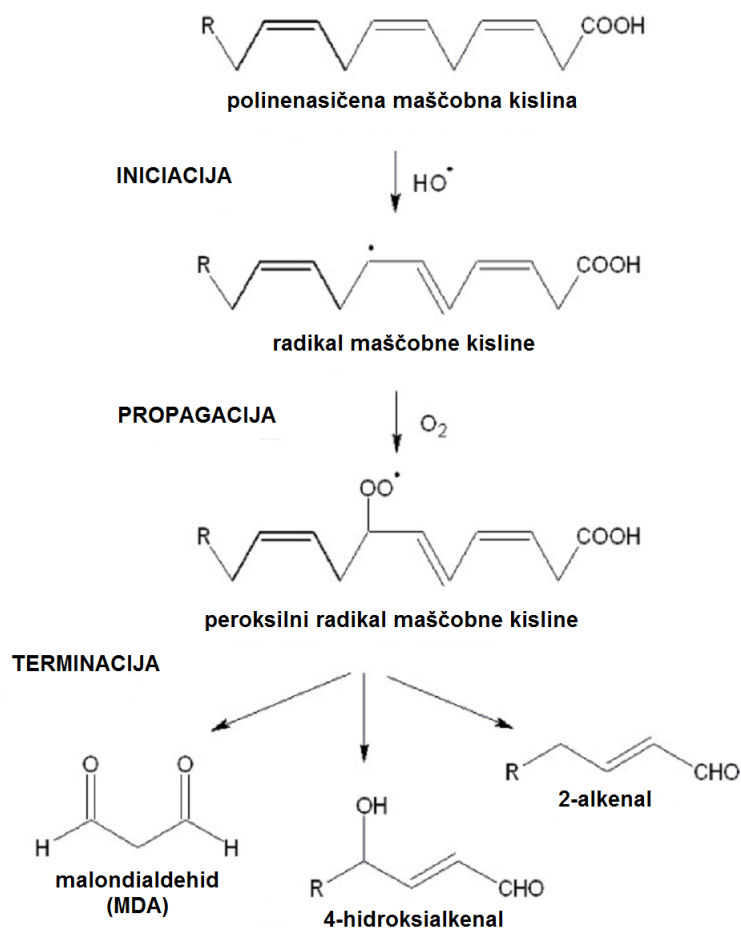
Reakcije lipidne peroksidacije potečejo v treh glavnih korakih, ki jih imenujemo iniciacija, propagacija in terminacija (Mimica-Dukić in sod., 2012) (Slika 2).

V reakciji iniciacije nastane radikal maščobne kisline. Reakcija se začne z napadom kisikovega radikala na lipid ter odvzemom vodika iz metilne skupine polinenasičene maščobne kisline. Zaradi prisotnosti dvojne vezi ob metilni skupini je C-H vez metilne skupine šibkejša in posledično je vodik bolj dovzeten za odvzem. V reakciji odvzema vodika lahko sodelujejo različni radikali, in sicer hidroksilni ($\cdot\text{OH}$), alkoksilni ($\text{RO}\cdot$), peroksilni ($\text{ROO}\cdot$) radikali, ne pa tudi H_2O_2 in $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Gutteridge, 1988).

V reakciji propagacije lipidni radikal reagira z molekularnim kisikom ter tvori peroksidni radikal ($\text{ROO}\cdot$). Peroksidni radikal lahko odvzame vodik iz bližnje nenasičene maščobne kisline, pri čemer nastane lipidni hidroperoksid (ROOH) ter nov lipidni radikal. Tako pride do verižne reakcije lipidne peroksidacije (Halliwell in Gutteridge, 1984).

Verižna reakcija lipidne peroksidacije se konča z razpadom lipidnih hidroperoksidov. Z njihovo razgradnjo se tvorijo sekundarni produkti lipidne peroksidacije, kot so ogljikovodikovi plini (etan in pentan) ter aldehidi (malondialdehid (MDA) in 4-hidroksinonenal (HNE)). Aldehidi povzročajo poškodbe DNA in proteinov (Esterbauer in sod., 1991; Parola in sod., 1999).

Lipidni hidroperoksidi lahko reagirajo s prehodnimi kovinskimi ioni (kot npr. Fe^{2+}), pri čemer nastanejo alkoksilni radikali ($\text{RO}^\bullet$). Tako kot peroksilni radikali, lahko tudi alkoksilni radikali sprožijo verižno reakcijo lipidne peroksidacije z odvzemom vodikovega atoma (Buettner, 1993).



Slika 2: Stopnje lipidne peroksidacije (Mimica-Dukić in sod., 2012).

Figure 2: Steps in lipid peroxidation process (Mimica-Dukić et al., 2012).

Kvasovke niso zmožne sinteze nenasičenih maščobnih kislin, zato preferenčno vgrajujejo v svoje membrane nenasičene maščobne kisline, ko so prisotne v rastnem mediju ter tako povečujejo možnost lipidne peroksidacije ob prisotnosti oksidativnega stresa (Bilinski in sod., 1989).

2.4.2 Oksidativne poškodbe DNA

Oksidativne poškodbe DNA vključujejo enoverižne in dvoverižne lome DNA, poškodbe purinskih in pirimidinskih baz in deoksiriboz, izgubo baz ter navzkrižne povezave DNA-protein (Henle in Linn, 1997; Finn in sod., 2011).

Zaradi poškodb DNA prihaja do zaustavitve ali indukcije transkripcije, indukcije signalnih poti, napak pri podvojevanju DNA ter nestabilnosti genoma (Marnett, 2000; Cooke in sod., 2003). Oksidativne poškodbe, ki vplivajo na DNA integriteto in funkcionalnost, povezujejo z nastankom raka (Ames in sod., 1995) in procesom staranja (Burhans in Weinberger, 2012).

Prooksidanti in ROS lahko povzročijo oksidacijo DNA le preko dveh oblik ROS (Halliwell in Aruoma, 1991). Glavno vlogo pri oksidativnih pošodbah DNA ima hidroksilni radikal. Singletni kisik oksidira gvaninske baze (Halliwell in Cross, 1994) v 7,8-dihidro-8-oksogvanin, ki je dobro poznan marker oksidativnih poškodb DNA (Jenner, 1994; Daroui in sod., 2004).

Mitohondrijska DNA je veliko bolj izpostavljena pošodbam kot jedrna DNA iz več razlogov (Inoue in sod., 2003):

- mitohondriji so vir reaktivnih kisikovih zvrsti,
- mitohondrijska DNA v nasprotju z jedrno ni zaščiten s histoni,
- mitohondrijski popravljalni sistem je omejen, saj nima izrezovalnega popravljalnega sistema.

2.4.3 Oksidativne poškodbe proteinov

Oksidacija proteinov *in vivo* je posledica aerobne respiracije. Reaktivne kisikove zvrsti nastajajo tekom aerobnega metabolizma ali izhajajo iz okolja ter povzročajo oksidacijo aminokislin in kofaktorjev proteinov, kar ima navadno za posledico izgubo funkcije proteina oziroma encimske aktivnosti (Grune in sod., 1997). Aminokisline, ki so posebno podvržene oksidaciji so cistein, metionin, triptofan, histidin in tirozin (Hensel in sod., 2011). Dovzetnost za oksidacijo se zmanjšuje v enakem vrstnem redu kot so aminokisline našteje. Do poškodb proteinov prihaja tudi sekundarno, z oksidativno modificiranimi ogljikovodiki in lipidi (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Oksidativne poškodbe so lahko prisotne tako v ogrođju proteinov kot tudi na vseh aminokislinah v stranskih verigah. ROS lahko povzročijo fragmentacijo ogrođja proteinov ter intra- in inter-molekularne prečne povezave (Stadtman, 2006). Stopnja poškodbe proteinov je odvisna od strukture proteina, mesta poškodbe, lokacije reaktivne komponente glede na lokacijo proteina in koncentracije

antioksidativne substance (Grune, 2000; Davies, 2012). Proteini se pred oksidacijo lahko zaščitijo s trehalozo, delno denaturirani proteini pa tudi s šaperoni (Benaroudj in sod., 2001; Sigler in sod., 1999).

Superoksidni radikali specifično oksidirajo 4Fe-4S centre encimov (pri npr. mitohondrijski akonitazi in izopropil malat izomerazi) in povzročajo sproščanje železa ter inaktivacijo proteinov (Halliwell in Gutteridge, 2000). Zaradi oksidacije 4Fe-4S centra akonitaze se zmanjša respiratorna aktivnost. Sproščeno železo povzroča nastanek hidroksilnih radikalov, ki še dodatno povzročajo poškodbe (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Med vsemi aminokislinami sta na oksidacijo najbolj občutljiva cistein in metionin. Različne ROS oksidirajo metionin do metionin-S-sulfoksida (Met-S-SO) in metionin-R-sulfoksida (Met-R-SO). Tovrstna oksidacija je reverzibilna, medtem, ko je oksidacija metionin sulfoksida do metionin sulfona ireverzibilna (Boschi-Muller in sod., 2008). Z oksidacijo tiolnih skupin cisteina nastanejo tiolni radikal ($-S^{\bullet}$), disulfidna vez ($-S-S-$), mešani disulfidi (npr. z glutationom), sulfenična ($-SOH$), sulfenična (SO_2H) ter sulfonična ($-SO_3H$) kislina. Tiolna skupina se najprej oksidira do sulfenične kisline, ki je nestabilna in se lahko reducira nazaj do tiolne skupine ali pa se ireverzibilno oksidira preko sulfenične do sulfonične kisline (Padgett in Whorton, 1998; Townsend, 2007). Tiolne skupine so najbolj občutljive strukture proteinov na reaktivne kisikove zvrsti. Kadar pride do oksidacije tiolnih skupin, ki so pomembne za aktivnost proteina, ta postane nefunkcionalen. Oksidacija žveplovega atoma cisteina lahko vodi v nastanek intra- in intermolekularnih disulfidnih vezi (Stadtman, 2006).

Hidroksilni radikal, ki nastane v reakciji vodikovega peroksida s kovinskimi ioni, povzroči najbolj izrazite oksidativne poškodbe proteinov, in sicer tvorbo karbonilov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Reaktivne kisikove zvrsti lahko reagirajo direktno s proteini, ali pa reagirajo s sladkorji in lipidi ter tako povzročijo nastanek reaktivnih molekul, ki nato reagirajo s proteini. Karbonili nastanejo v eni od štirih poznanih oksidativnih poteh. Nastanejo lahko z direktno oksidacijo lizina, arginina, prolina in treonina v stranskih verigah proteina, katere produkt so ustrezni aldehidi in ketoni ali z oksidativnim cepljenjem peptidnih vezi v ogrodju proteina. Tvorijo se tudi v reakciji lizinskih, argininskih in cisteinskih ostankov v stranskih verigah proteinov s produkti lipidne peroksidacije (4-hidroksinonenal, malondialdehid) ter v reakciji z reaktivnimi produkti, ki nastanejo v reakciji reducirajočih sladkorjev in njihovih oksidiranih produktov z amino skupinami lizinskih ostankov proteinov (Stadtman, 2006). Karbonilacija proteinov je ireverzibilna poškodba, ki vodi v izgubo funkcije proteina. Je splošen indikator resnih oksidativnih poškodb ter nepravilnega delovanja proteinov zaradi staranja in bolezni (Berlett in Stadtman, 1997).

Modifikacije in cepitve proteinskih molekul močno spremenijo njihovo konformacijo ter inaktivirajo encime (Sigler in sod., 1999). Oksidacija aminokislin v proteinih ima za posledico odvijanje proteinov. Značilnost oksidiranih proteinov je povečana površinska hidrofobnost, ki nastane zaradi odvijanja proteinov ter izpostavitve hidrofobnih aminokislin, ki so običajno v sredini proteina. Površinska hidrofobnost narašča z večanjem stopnje poškodb (Lasch in sod., 2001). Razviti proteini težijo k agregaciji ter prečnemu povezovanju. Delno razvite proteine običajno razgradijo proteasomi (Pacifici in Davies, 1990; Giulivi in sod., 1994; Lasch in sod., 2001). Če do proteolize ne pride, hidrofobni proteini tvorijo agregate, v katerih pride do nastanka kovalentnih vezi ter prečnega povezovanja reaktivnih skupin, nastalih med oksidacijo. Prečno povezani proteinski agregati niso substrat za proteasom, zato se kopičijo v celici in povzročajo smrt celic (Bader in Grune, 2006; Grune in sod., 2003; Mehrlase in Grune, 2002; Grune, 2000; Shringarpure in sod., 2001).

2.5 ENDOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI

Ko celice zaznajo povišano količino reaktivnih kisikovih zvrsti, se sprožijo molekularni mehanizmi, ki jih imenujemo stresni odgovor. Prilagoditev na stresne razmere vključuje zgodnje in pozne odzive. Zgodnji odzivi zagotovijo skoraj takojšnjo zaščito pred subletalnimi razmerami, medtem ko pozni stresni odgovori zagotovijo bolj učinkovito zaščito proti stresu. V okviru zgodnjega odziva se s posttranslacijskimi aktivacijami aktivirajo že obstoječi obrambni sistemi in signalne poti, ki sprožijo pozne odgovore (sintezo stresnih proteinov ter antioksidativnih obrambnih sistemov) (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Antioksidant je vsaka snov, ki že v nizki koncentraciji (v primerjavi s koncentracijo substrata, ki je tarča radikalov) opazno zadrži ali prepreči oksidacijo substrata (Halliwell in Gutteridge, 2000). Antioksidanti ščitijo celice pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi na več načinov, in sicer z vezavo kovinskih ionov, encimsko odstranitvijo oksidantov ali z reakcijo z ROS (Sigler in sod., 1999).

Endogene antioksidativne obrambne sisteme delimo na primarne in sekundarne. Vloga primarnih obrambnih sistemov je, da preprečijo začetne in/ali propagacijske reakcije radikalov in oksidantov s celičnimi komponentami. Med primarne antioksidativne obrambne sisteme sodijo encimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza,...) in neencimski (glutathion, tioredoksin,...) obrambni sistemi. Ko raven oksidantov oz. radikalov naraste do take mere, da primarni obrambni sistemi niso več zadostni in se pojavijo poškodbe, prevzamejo vlogo obrambe sekundarni obrambni sistemi, med katere uvrščamo proteolitične sisteme, lipolitične encime in popravilne sisteme DNA (Davies, 1986).

2.5.1 Primarni encimski antioksidativni obrambni sistemi

Kvasovke so razvile številne encimske primarne obrambne sisteme, ki jih delimo v dve skupini. V prvo skupino sodijo encimi, ki odstranjujejo ROS, v drugo pa encimi, ki delujejo kot redoks regulatorji tiolnih skupin proteinov ter vzdržujejo redoks stanje kvasovk. Delovanje obeh tipov antioksidativnih obrambnih sistemov se prekriva. V različnih celičnih razdelkih (citosolu in mitohondrijih) se nahajajo ločeni encimski sistemi z identičnimi biokemijskimi aktivnostmi, le da so prilagojeni na posamezen razdelek (Herrero in sod., 2008).

Preglednica 2: Primarni antioksidativni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Walker, 1998).

Table 2: Yeast primary antioxidative defense system (Moradas-Ferreira et al., 1996; Walker, 1998).

Obrambni sistemi	Funkcija
encimski obrambni sistemi	
Cu/Zn superoksid dismutaza	razgradnja superoksidnega aniona v citoplazmi
Mn superoksid dismutaza	razgradnja superoksidnega aniona v mitohondriju
katalaza A	razgradnja vodikovega peroksida v peroksisomih
katalaza T	razgradnja vodikovega peroksida v citoplazmi
tioredoksin reduktaza*	redukcija oksidiranega tioredoksina
tioredoksin peroksidaza	razgradnja vodikovega peroksida in alkiliranih hidroperoksidov
glutation reduktaza*	redukcija oksidiranega glutaciona
glutation peroksidaza	redukcija vodikovega peroksida in lipidnih hidroperoksidov v reakciji z glutationom
citokrom c peroksidaza	redukcija vodikovega peroksida
glukoza-6-P-dehidrogenaza	redukcija NADP ⁺ v NADPH
ne-encimski obrambni sistemi	
glutation*	lovljenje prostih radikalov, redukcija S-S mostičkov v proteinih
glutaredoksin*	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
tioredoksin*	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
metalotionini	vezava Cu, lovljenje superoksidnih in hidroksilnih radikalov
poliamini	zaščita lipidov pred oksidacijo

* Obrambne sisteme lahko uvrščamo tudi v sekundarne antioksidativne obrambne sisteme, ker popravljajo oksidativne poškodbe proteinov

2.5.1.1 Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza je encim, ki katalizira pretvorbo superoksidnega aniona v kisik in vodikov peroksid. Je metaloencim, ki za svojo aktivnost potrebuje kovinske ione (Fridovich, 1995; Culotta in sod., 2006). Tako kot drugi evkarionti, imajo tudi kvasovke dve superoksid dismutazi: mitohondrijsko MnSOD (Sod2) ter citoplazemsko Cu/ZnSOD (Sod1), ki se nahaja tudi v mitohondrijskem intermembranskem prostoru (Culotta in sod., 2006; Sturtz in sod., 2001).

Sod1 je visoko ohranjen encim, ki ima približno 80 % homologijo s humano Cu/ZnSOD. Je homodimer iz dveh podenot, velikih 16 kDa, ki sta povezani preko hidrofobnih interakcij (Lynch in sod., 2004). Vsaka od podenot je sestavljena iz 8 antiparalelnih polipeptidnih verig v β konformaciji, s tremi zunanji zankami ter ima vezan en atom bakra (Cu) in cinka (Zn) (Galiazzo in sod., 1994; Gosciniak in Fridovich, 1972). Bakrov ion je pomemben za katalitično aktivnost encima, cinkov pa pomembno prispeva k stabilnosti strukture encima, daje pozitivni naboj ter omogoča nastanek strukture, ki omogoča interakcijo s šaperonom Ccs1, ki sodeluje pri zorenju encima. V postopek zorenja Sod1 do funkcionalnega proteina so vključene tri posttranslacijske modifikacije: vključitev bakra in cinka, tvorba disulfidne vezi znotraj obeh podenot ter dimerizacija. Zaradi tovrstne kompaktne strukture je encim zelo stabilen, odporen na segrevanje, proteolizo ter denaturacijo z nekaterimi reagenti, kot sta natrijev dodecil sulfat in urea (Galiazzo in sod., 1994; Fridovich, 1995). Sod1 je pomembna za obrambo pred superoksidnimi anioni, ki imajo eksogeni izvor ter tistimi, ki iz mitohondrija difundirajo v intermembranski prostor (Furukawa in sod., 2004).

Sod2 se nahaja v mitohondrijih. Sestavljena je iz 4 podenot enakih velikosti in ima molekulsko maso 96 kDa. Vsaka podenota ima vezan en atom mangana v obliki Mn(III) (Ravindranath in Fridovich, 1975). Pomembna je za obrambo pred superoksidnimi anioni, ki nastajajo v mitohondrijih (van Loon in sod., 1986; Guidotti in sod., 1993; Costa in sod., 1997).

2.5.1.2 Katalaza

Katalaza katalizira razgradnjo vodikovega peroksida do kisika in vode (Jamieson, 1998). *S. cerevisiae* ima dva gena: *cta1* za katalazo A in *ctt1* za katalazo T (Ruis in Hamilton, 1992). Katalaza A se nahaja v peroksisomih, v katerih odstranjuje vodikov peroksid, ki nastaja pri β -oksidaciji maščobnih kislin, medtem ko se katalaza T nahaja v citoplazmi (Hiltunen in sod., 2003). Vloga katalaze T je manj specifična, saj se njeno izražanje poveča v različnih stresnih razmerah, kot so temperaturni in osmotski stres, stradanje ter ob stresu povzročenem z vodikovim peroksidom (Martinez-Pastor in sod., 1996). Encima sta

tetramerna homoproteina. Vsaka podenota ima vezan en atom železa (Ruis in Hamilton, 1992).

2.5.1.3 Peroksidaza

V nasprotju s superoksid dismutazo in katalazo, delovanje peroksidaze ni odvisno od redoks stanja atoma kovine. Peroksidaza anorganske in organske perokside ter H_2O_2 reducira v ustrezne alkohole oziroma vodo s cisteinskimi tioli v aktivnem mestu. V prvi vrsti reducira lipidne hidroperokside in šele nato vodikov peroksid. Pri tem se cistein v aktivnem mestu peroksidaze oksidira do sulfenične kisline (Herrero in sod., 2008; Halliwell in Gutteridge, 2000). Glede na vrsto donorja elektronov, ki sulfenično kislino reducira v cistein, ločimo glutathion peroksidazo (donor elektronov je glutathion) ter tioredoksin peroksidazo oz. peroksiredoksin (reducent je tioredoksin) (Herrero in sod., 2008).

Kvasovke imajo dve vrsti glutathion peroksidaz: klasične, multimerne glutathion peroksidaze, ki katalizirajo redukcijo anorganskih in organskih hidroperoksidov in fosfolipidne hidroperoksidne peroksidaze, ki so vezane z membranami in lahko poleg topnih hidroperoksidov reducirajo tudi hidroperokside lipidov v membrani (Halliwell in Gutteridge, 2007; Brihelius-Flohe, 2006). Glutathion peroksidaza ima višjo afiniteto do vodikovega peroksida kot katalaza, zato je za detoksifikacijo manjših količin H_2O_2 (posebno v mitohondrijih) pomembna glutathion peroksidaza, pri višjih koncentracijah pa prevzame vlogo katalaza (Jacob in sod., 1965; Klein in sod., 1998; Halliwell in Gutteridge, 2000).

Poleg glutathion peroksidaz ima *S. cerevisiae* tudi pet tioredoksin peroksidaz: Tsa1, Tsa2 in Ahp1 so citoplazemske, Prx1 je mitohondrijska in Dot5, ki je v jedru (Park in sod., 2000). Dokazali so, da imata Tsa1 in Tsa2 dvojno vlogo. V odsotnosti stresa sta v nizkomolekularni obliki in imata peroksidazno aktivnost. Oksidativni stres pa inducira nastanek visokomolekularnih kompleksov, ki imajo vlogo šaperonov (Jang in sod., 2004). Podobno kot Tsa1 in Tsa2, naj bi imele tudi druge tioredoksin peroksidaze dvojne vloge (Jeffery, 2003; Singer in sod., 1998; Izawa in sod., 2004).

2.5.2 Primarni neencimski antioksidativni obrambni sistemi

Eden glavnih neencimskih antioksidativnih obrambnih sistemov v celicah je glutathion. Glutathion je tripeptid (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin), ki obstaja v reducirani obliki kot glutathion (GSH) ali oksidirani obliki kot glutathion disulfid (GSSG). Biološka pomembnost glutathiona je odvisna od redoks stanja aktivne proste SH skupine cisteina, ki se v reakciji

glutationa z oksidanti oksidira ter se iz reducirane oblike (GSH) spremeni v oksidirano obliko (GSSG). Za vzdrževanje visokega razmerja GSH/GSSG v celici je potrebna ponovna redukcija oksidirane oblike nazaj v reducirano. GSSG se regenerira v reducirano obliko v prisotnosti NADPH z glutathion reduktazo (Grant in sod., 1996a, 1996b; Izawa in sod., 1995).

Je učinkovit lovilc hidrosilnih radikalov, reagira s singletnim kisikom in je substrat za glutathion peroksidazo (Jamieson, 1992). V času oksidativnega stresa tvori s sulfhidrilnimi skupinami proteinov mešane disulfide (Gilbert, 1984; Ziegler, 1985). Nastanek mešanih disulfidov imenovan glutathionilacija je posttranslacijska modifikacija, ki zaščiti sulfhidrilne skupine proteinov pred oksidacijo do sulfonične kisline. Glutathionilacija na aktivnost proteinov vpliva bodisi pozitivno ali negativno (Gao in sod. 2009) in je nestabilna posttranslacijska modifikacija, ker je možna deglutathionilacija z glutaredoksinom (Rouhier in sod., 2008).

Pomembna vloga glutathiona je tudi vzdrževanje redoks stanja v celicah. Redoks stanje je odvisno od razmerja med GSH in GSSG, ki v endoplazmatskem retikulumu znaša 2 : 1 ter v citoplazmi 60 : 1. Citoplazma je reducirajoče okolje, medtem ko je v endoplazmatskem retikulumu razmerje precej nižje in je okolje bolj oksidirajoče. Ravnotežje reducirane in oksidirane oblike glutathiona igra ključno vlogo pri vzdrževanju aktivnih, reduciranih celičnih proteinov (Klein in sod., 1998).

2.5.3 Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi

Ko raven oksidantov naraste in primarni antioksidativni obrambni sistemi niso več zadostni ter nastanejo poškodbe, prevzamejo v celicah vlogo sekundarni antioksidativni obrambni sistemi. Sekundarni obrambni sistemi so proteolitični sistemi, lipolitični encimi in popravljalni sistemi DNA (Davies, 1986).

Glavni lipolitični encimi, ki popravljajo poškodbe nastale v procesu lipidne peroksidacije so fosfolipaza, glutathion peroksidaza in fosfolipid hidroperoksid glutathion peroksidaza. Oksidirani lipidi celičnih membran so substrati fosfolipaz. Fosfolipaza A₂ je encim, ki katalizira hidrolizo sn-2 estrske vezi (vez na drugem ogljikovem atomu glicerola) glicerofosfolipidov, pri čemer nastane prosti hidroperoksid maščobne kisline in lizofosfolipid. Sproščeni hidroperoksidi maščobne kisline so substrat za glutathion peroksidazo, ki ga reducira v ustrezno hidroksi maščobno kislino. Lizofosfolipidi, ki ostanejo v membranah so substrati za reakcije reacetilacije (ponovna adicija maščobne kisline na sn-2 mesto), ki regenerira intaktne fosfolipide. Redukcija hidroperoksidov maščobnih kislin pa je možna tudi brez hidrolize in sprostitve iz membran. V nasprotju z glutathion peroksidazo, katere substrat so prosti hidroperoksidi maščobne kisline, fosfolipid

hidroperoksid glutation peroksidaza katalizira redukcijo fosfolipidnih hidroperoksidov v membrani (Davies, 2000).

Glavna popravljalna sistema DNA sta popravljanje z izrezovanjem baze (BER) in popravljanje z izrezovanjem nukleotidov (NER). BER služi za popravljanje metiliranih, deaminirani in oksidiranih baz ter apurinskih/apirimidinskih mest (AP mesta). NER služi za popravilo večjih aduktov, pirimidinskih dimerov ter drugih poškodb, ki povzročijo večje strukturne nepravilnosti. Mehanizem popravljanja z izrezovanjem baze naj bi bil primarni obrambni mehanizem za popravilo oksidativnih poškodb DNA. Mehanizem popravljanja z izrezovanjem nukleotidov naj bi bil le rezervni sistem (Tyson in Mathers, 2007; Boer in Hoeijmakers, 2000; De Ruyck in sod., 2007). Osnovne stopnje pri popravljanju DNA z izrezovanjem so prepoznavanje poškodbe, odstranitev poškodbe z izrezom dela ene verige, zapolnitev vrzeli s polimerazo (uporabi se genetska informacija iz komplementarne verige) ter ligacija prekinjene verige (Özsavci, 2007).

Za popravilo oksidativno poškodovanih proteinov je poznanih in opisanih zelo malo popravljanih mehanizmov. Večina oksidativno poškodovanih proteinov se odstrani z razgradnjo, le oksidacija žveplo vsebujočih aminokislin (cisteina in metionina) je reverzibilna (Holmgren, 2000; Fu in sod., 1998; Halliwell in Gutteridge, 2000; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.5.3.1 Popravilo reverzibilno poškodovanih proteinov

Glavna mehanizma, ki popravljata tovrstne modifikacije, sta glutaredoksin in tioredoksin. Pomembna sta za obrambo pred oksidativnim stresom in za uravnavanje bioloških funkcij v katerih je pomembno redoks stanje sulfhidrilnih skupin (Holmgren, 1989). Proteini, ki imajo oksidirane cisteine, se reaktivirajo z redukcijo z glutationom, glutaredoksinom, tioredoksinom ali protein disulfid izomerazo. Redukcijo metionin sulfoksida povzroči metionin sulfoksid reduktaza (Halliwell in Gutteridge, 2000; Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Oba sistema sta prisotna v mitohondrijih in citoplazmi, medtem, ko je glutaredoksin sistem prisoten tudi v jedru (Herrero in sod., 2008). Tiorredoksin in glutaredoksin sta majhna ubikvitarna proteina, ki sta del tiol/disulfid oksidoreduktazne družine, katerih proteini vsebujejo redoks aktivne disulfide v aktivnem centru (Holmgren, 2000).

2.5.3.1.1 Tioredoksinski sistem

Tioredoksinski sistem tvorijo tioredoksin, tioredoksin reduktaza in NADPH. Tioredoksinski sistem reducira disulfidne vezi in sulfenično kislino različnih proteinov. Tioredoksin vsebuje dva ohranjena cisteina, ki sta bodisi v reducirani obliki (tioredoksin(SH)₂) ali v oksidirani obliki (tioredoksin-S₂), ki vsebuje intramolekularno disulfidno vez. Sulfhidrilna skupina je donor elektronov za redukcijo disulfidnih vezi ali sulfenične kisline proteinov. Oksidirani tioredoksin reducira tioredoksin reduktaza, donor elektronov pa je NADPH (Holmgren, 1989). *S. cerevisiae* ima dva ločena in samostojna tioredoksinska sistema. Citoplazemski tioredoksinski sistem predstavljata tioredoksina Trx1 in Trx2 in tioredoksin reduktaza Trr1 (Trotter in Grant, 2005). Sistem naj bi imel nekatere identične funkcije kot glutaredoksinski sistem (Muller, 1996; Draculic in sod., 2000). Mitohondrijski tioredoksinski sistem, ki ga sestavljata tioredoksin Trx3 in tioredoksin reduktaza Trr2 naj ne bi mogel nadomestiti ne citoplazemskega tioredoksinskega niti glutaredoksinskega sistema (Draculic in sod., 2000; Trotter in Grant, 2005).

2.5.3.1.2 Glutaredoksinski sistem

Glutaredoksinski sistem tvorijo glutaredoksin, glutation, NADPH in glutation reduktaza. Glutaredoksin (Grx) katalizira redukcijo disulfidnih vezi in mešanih disulfidov (npr. z glutationom). Oksidirani glutaredoksin se reducira s pomočjo glutationa, ki je donor elektronov (Holmgren, 1989; Fernandes in Holmgren, 2004; Toledano in sod., 2007). Redukcijo glutation disulfida (GSSG) v glutation (GSH) katalizira glutation reduktaza, katere donor elektronov je NADPH (Herrero in sod., 2008; Akterin in sod., 2006). Kvasovke imajo podobno kot bakterije, rastline in ljudje monotiolne in ditiolne glutaredoksine z Cys-Pro-Tyr-Cys oziroma Cys-Gly-Phe-Ser ohranjenima zaporedjema v aktivnem mestu. Monotiolni glutaredoksini (Grx-SH) katalizirajo le redukcijo protein-glutation mešanih disulfidov (protein-S-S-G), medtem ko ditiolni glutaredoksini (Grx-(SH)₂) reducirajo proteinske disulfide (protein-S₂) in glutation-protein mešane disulfide (protein-S-S-G) (Vlamiš-Gardikas in Holmgren, 2002).

S. cerevisiae ima dva citosolna ditiolna glutaredoksina (Grx1 in Grx2), dva jedrna monotiolna glutaredoksina (Grx3 in Grx4) ter mitohondrijski monotiolni glutaredoksin (Grx5). Pri odzivu na oksidativni stres so pomembni vsi (Vlamiš-Gardikas in Holmgren, 2002; Luikenhuis in sod., 1998; Rodriguez-Manzanique in sod., 1999).

2.5.3.1.3 Msr sistem

Oksidacija metionina vodi do nastanka mešanice S- (Met-S-SO) in R- (Met-R-SO) epimerov metionin sulfoksida. Nastale metionin sulfoksidge reducira metionin sulfoksid reduktazni sistem (MSR sistem). Encimski sistem prepreči ireverzibilno oksidacijo metionina do metionin sulfona (Met-SO₂). MSR sistem tvorita encima MsrA in MsrB, ki katalizirata redukcijo S- (MsrA) in R- (MsrB) epimerov (Moskovitz, 2005). Za redukcijo encimov MsrA in MsrB je odgovoren tioredoksin (Stadtman in sod., 2005).

2.5.3.2 Proteoliza

Proteine, ki so ireverzibilno poškodovani bodisi zaradi nastanka metionin sulfona, cisteinske sulfinične/sulfonične kisline ali karbonilov, kvasni antioksidativni obrambni sistemi ne morejo popraviti, zato jih morajo razgraditi. Nezmožnost celic, da odstrani oksidativno poškodovane proteine vodi v še večje poškodbe proteinov ter njihovo prečno povezovanje in tvorbo agregatov. Proteinski agregati so težko razgradljivi in toksični. Povezujejo jih z nastankom številnih bolezni in staranjem (Petropoulos in Friguet, 2005). Povzročajo namreč poškodbe mitohondrijev in inhibicijo proteasomov, kar ima za posledico še večje količine nastalih ROS, zmanjšano razgradnjo oksidiranih proteinov ter nastanek še večjih poškodb v celici. Zato je selektivna razgradnja oksidiranih proteinov ključnega pomena za vzdrževanje celične homeostaze. Po nastanku oksidativnih poškodb pride do indukcije genov, ki sodelujejo v katabolizmu proteinov (Marques in sod., 2006). Razgradnja proteinov *S. cerevisiae* poteka z nespecifično proteolizo v vakuolah ter specifično proteolizo s proteasomi (Hilt in Wolf, 1992).

2.5.3.2.1 Specifična proteoliza

Proteasomi so veliki proteazni encimski kompleksi, ki so sestavljeni iz številnih podenot. Nahajajo se v citoplazmi, jedru in mitohondrijih ter so pomembni za razgradnjo neobičajnih, poškodovanih ali napačno zviti proteinov. *S. cerevisiae* ima 20S in 26S proteasome (Walker, 1998).

20S proteasomi so sestavljeni iz številnih nizkomolekularnih podenot, urejenih v steber iz 4 obročev. Vsak obroč sestavlja sedem podenot (Hilt in Wolf, 1996). Za razgradnjo proteinov ne potrebujejo ubikvitina in ATP (Davies, 2001).

26S proteasomi so veliki proteazni kompleksi, ki so zgrajeni iz 20S katalitične sredice in 19S regulatornega jedra. Regulatorna podenota 26S proteasoma vključuje ATP-aze, encime za odstranitev ubikvitina s proteinov ter podenote za vezavo poliubikvitina. 26S

proteasomi razgradijo konjugate protein/ubikvitin v od ATP odvisni reakciji. Proteini se razgradijo, ubikvitin pa se regenerira (Hilt in Wolf, 1996).

Ubikvitin je protein z molekulsko maso 8,5 kDa in je visoko ohranjen protein pri vseh evkariontih (Hilt in Wolf, 1992). Ubikvitinilacija je splošen mehanizem za označevanje proteinov za razgradnjo s proteasomi in poteka s kompleksnim encimskim sistemom. Ta vključuje pritrditev mnogih molekul ubikvitina na protein, ki je namenjen razgradnji (Hilt in Wolf, 1996). Potrebna je aktivacija ubikvitina ter njegova konjugacija na lizin ciljanega proteina (Hilt in Wolf, 1992; Shang in sod., 1997).

Za razgradnjo oksidativno poškodovanih proteinov so odgovorni le 20S proteasomi. Dokazali so namreč, da se v času oksidativnega stresa poveča izražanje genov, ki nosijo zapis za podenote 20S proteasoma ter da pride do inhibicije 26S proteasomov ter encimov, ki aktivirajo in konjugirajo ubikvitin (Shringarpure in sod., 2003). Oksidirane aminokisline oksidativno modificiranih proteinov se razgradijo kot vir ogljika, medtem ko se večina nespremenjenih aminokislin po hidrolizi najverjetneje porabi za sintezo nadomestnih proteinov (Davies, 2001).

Proteolitični sistemi se nahajajo tudi v mitohondrijih. Mitohondriji sesalcev imajo od ATP odvisne Lon proteaze, ki razgrajujejo oksidirane proteine. Vloga kvasnih Lon proteaz (Pim1) pri razgradnji oksidiranih proteinov mitohondrijskega matriksa še ni pojasnjena (Bulteau in sod., 2006).

2.5.3.2.2 Nespecifična proteoliza

Proteoliza v vakuolah je pomembna za celično homeostazo. Izražanje genov, ki kodirajo proteaze vakuol in genov, katerih produkti sodelujejo pri usmerjanju proteinov v vakuole se po nastanku oksidativnih poškodb močno poveča. Naraste tudi aktivnost Pep4 aspartil proteaze, ki je pomembna v posttranslacijskem zorenju prekurzorjev vakuolarnih proteaz. Povečano izražanje gena, ki kodira Pep4 proteazo omogoča celicam, da odstranijo naraščajoče število poškodovanih proteinov med stresom in preprečijo akumulacijo oksidiranih proteinov (Marques in sod., 2006).

2.6 EKSOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM

Raziskave na kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* so omogočile pomembne in obsežne informacije o oksidativnem stresu ter mehanizmih odziva nanj. Za vzdrževanje redoks ravnotežja so odgovorni številni endogeni encimi. Poleg encimov pa celice sintetizirajo ali prevzamejo iz okolja tudi številne majhne antioksidativne molekule, ki začasno zadržijo ali preprečijo oksidacijo lipidov, DNA in proteinov. Tovrstne molekule so v središču mnogih raziskav zaradi ugodnih učinkov na zdravje ljudi (Halliwell, 1996). Molekule, ki delujejo antioksidativno in jih mikroorganizmi prevzamejo iz okolja ter ljudje zaužijejo s hrano imenujemo eksogeni antioksidanti.

Čeprav je bilo za mnoge učinkovine iz živil ali prehranskih dopolnil z *in vitro* metodami dokazano, da so učinkoviti antioksidanti, pa je učinkovitost le teh v celicah in organizmih lahko povsem drugačna, ker je odvisna od njihovega vstopa v celico, metabolizma ter stranskih produktov njihove reakcije z oksidanti (Bast in Haenen, 2002; Boots in sod., 2007).

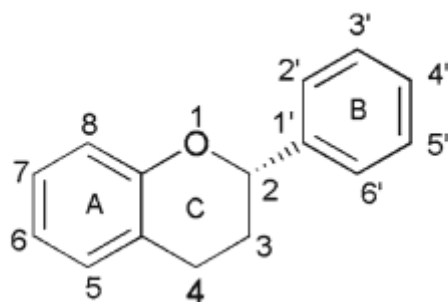
Antioksidanti lahko v celicah delujejo direktno ali indirektno. Direktni antioksidanti so redoks aktivni, kratko živeči in se v reakciji z oksidantom potrošijo, zato se morajo ponovno regenerirati. Delujejo kot lovilci prostih radikalov, izzovejo lahko tudi prooksidativni učinek. Med prooksidante so uvrščene snovi, ki povzročajo oksidativne poškodbe ter snovi in dejavniki, ki te poškodbe pospešijo. Indirektni antioksidanti so lahko redoks aktivni, ni pa nujno, njihova življenjska doba je dolga, se ne porablajo in ne delujejo prooksidativno. Delujejo tako, da inducirajo sintezo endogenih antioksidantov. Zanje se uporablja tudi izraz pro-antioksidanti (Fahey in Talalay, 1999; Gao in sod., 2001; Vertuani in sod., 2004).

Razvrstitev antioksidantov je možna po več kriterijih: izvor (naraven, sintetični, eksogeni, endogeni), kemijsko fizikalne lastnosti (polaren, nepolaren), način delovanja (encimski, neencimski), struktura (polifenoli, tioli,...), mehanizem delovanja (lovilec prostih radikalov,...).

2.6.1 Kvercetin

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) je tipičen flavonoidni flavonol, ki se nahaja v kaprah, čebuli, brusnicah, borovnicah, citrusih, češnjah brokoliju, jabolkih, zelenem ter črnem čaju (Scalbert in Williamson, 2000). Flavonoidi so sekundarni metaboliti, naravno prisotni v rožah, zelenjavi in sadju (Kuhnau, 1976; Hertog in sod., 1993). So fenolne spojine zgrajene iz 15 ogljikovih atomov (Slika 3). Osnovni skelet flavonoidov je fenilbenzopiran ($C_6C_3C_6$), ki ga tvorita dva benzenova obroča (A in B), ki sta povezana

preko heterocikličnega obroča, ki vsebuje kisik (C). V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani. Sladkor je največkrat vezan na C₃ atom, lahko pa tudi na C₅ ali C₇ atom. Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon. Po aglikonu oziroma razlikah v strukturi heterocikličnega C obroča ločimo flavonoide na flavone, flavonole, flavanone, katehine, flavan-3,4-diole, antocianidine, dihidroflavonole, izoflavone, kalkone, neoflavone, dihidrokalkone in avrone (Abram in Simčič, 1997).

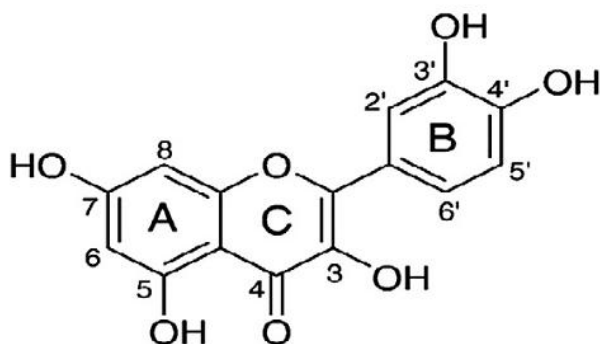


Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov (Pistelli in Giorgi, 2012).

Figure 3: The skeleton structure of flavonoides (Pistelli and Giorgi, 2012).

Kvercetin je običajno v obliki glikozida. Na eno od hidroksilnih skupin ima vezano glukozo, galaktozo, ramnozo, rutinozo ali ksilozo (Havsteen, 1983; Middleton in Kandaswami, 1993). Kljub petim hidroksilnim skupinam ima kvercetin lipofilne značilnosti, s številom sladkornih molekul pa njegova hidrofilnost narašča. Pripisujejo mu številne ugodne lastnosti, kot so antioksidativno (Song in sod., 2001), antiproliferativno (Yoshida in sod., 1990), antiinflamatorno (Comalada in sod., 2005; Dias in sod., 2005), antikancerogeno (Soleas in sod., 2006), antihipertenzivno (Duarte in sod., 2001), antidiabetično (Vessal in sod., 2003) delovanje. Poleg tega naj bi mnoge celice ščitil pred različnimi boleznimi, kot so osteoporoza in različni tipi raka ter pljučnimi in kardiovaskularnimi boleznimi (Boots in sod., 2008).

Kvercetin vsebuje vse strukturne elemente značilne za antioksidante: orto-dihidroksi oziroma kateholno skupino na obroču B, 2,3-dvojno vez ter hidroksilni skupini na mestih 3 in 5 (Silva in sod., 2002; Bors in sod., 1990) (Slika 4). Hidroksilni skupini kateholne strukture (o-dihidroksilne strukture) sta donorja elektronov, zato je kvercetin močan lovilec prostih radikalov, predvsem H₂O₂ in O₂^{•-} (Bors in sod., 1990; Rice-Evans in sod., 1996). Deluje tudi kot kelator (Brown in sod., 1998).



Slika 4: Molekulska struktura kvercetina (Chen, 2010).

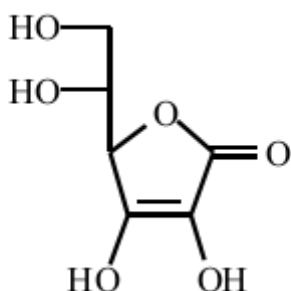
Figure 4: Molecular structure of quercetin (Chen, 2010).

V reakciji kvercetina s superoksidnim radikalom nastane radikal semikinona in vodikov peroksid. Ker je radikal semikinona nestabilen, se ponovno oksidira do kvercetin-kinona (QQ) (Metodiewa in sod., 1999). Kvercetin kinon ima štiri tautomerne oblike: orto-kinon in tri kinonmetide (Boots in sod., 2005). Kinon je zelo reaktiven s tiolnimi skupinami glutationa in proteinov. Kinon prednostno reagira s tioli glutationa, ki imajo nizko pKa vrednost in so zelo reaktivni. Produkta reakcije sta 6-glutationil kvercetin (6-GSQ) in 8-glutationil kvercetin (8-GSQ) (Awad in sod., 2002). Glutationil-kvercetin adukti niso stabilni in zato neprestano disociirajo v GSH in QQ. Ob dovolj visoki koncentraciji GSH, QQ ponovno reagira z glutationom in tvori GSQ. Glutation torej celicam nudi zaščito pred kvercetin-kinonom le, ko je njegova koncentracija visoka. Ko je koncentracija GSH nizka, disociiran QQ reagira s preostalimi tioli kot npr. tioli proteinov. Ker imajo običajno proteinski tioli višjo pKa vrednost kot GSH, so adukti kvercetin-protein veliko bolj stabilni kot GSQ. Vezava QQ na tiole proteinov vodi do povečane prepustnosti membrane (Yen in sod., 2003) ter spremenjene funkcije encimov, ki vsebujejo SH skupine (Kalyanaraman in sod., 1987; Boots in sod., 2002). Nastanek GSQ torej ne zagotavlja popolne zaščite pred QQ, temveč celo omogoča njegovo skladiščenje (Boots in sod., 2005). Pretvorbo kvercetina v potencialno toksičen produkt, ki nastane med lovljenjem ROS imenujemo paradoks kvercetina (Boots in sod., 2007).

2.6.2 Askorbinska kislina

L-askorbinska kislina (Slika 5) je trivialno ime za vodotopen antioksidant vitamin C, ki vstopa v oksido-redukcijske reakcije. Po kemijski strukturi je aldono-1,4 lakton heksuronske kisline (Davey in sod., 2000). Vir askorbinske kisline sta sveže sadje in zelenjava. Prisotna je v pomarančah, limonah, grenivkah, lubenicah, papajah, jagodah, melonah, mangu, ananasu, malinah in češnjah pa tudi zelenolistni zelenjavi, paradižniku, brokoliju, cvetači in zelju. Askorbinsko kislino sintetizirajo rastline in večina sesalcev, medtem ko je ljudje, opice, morski prašički, netopirji ter nekatere ptice zaradi odsotnosti

encima L-gulonolakton oksidaze ne morejo. Prekurzor sinteze askorbinske kisline pri sesalcih je UDP-glukuronska kislina, pri rastlinah pa GDP-L-galaktoza (Naidu, 2003; Smirnoff, 2001). *Saccharomyces cerevisiae* sintetizira analog askorbinske kisline D-eritroaskorbinsko kislino iz D-arabinoze (Huh in sod., 1998).



Slika 5: Struktura askorbinske kisline (Vertuani in sod., 2004).

Figure 5: Molecular structure of ascorbic acid (Vertuani et al., 2004).

Pomembna je za sintezo kolagena, karnitina, neurotransmiterjev, deluje kot imunomodulator (vpliva na delovanje imunskega sistema), ščiti pred virusom gripe, preprečuje nastanek ateroskleroze, deluje antiangiogeno, protivnetno in antikancerogeno (Chehue Romero in sod., 2013).

L-askorbinska kislina je odličen reducent (donor elektronov), ki vstopa v oksido-redukcijske reakcije. Pri oddaji enega elektrona se pretvori do radikalne oblike (semi-dehidroaskorbinske kisline), pri oddaji dveh elektronov pa do dehidroaskorbinske kisline (DHA), ki je končni produkt oksidacije. Ima relativno nizek redoks potencial, zato deluje kot lovilec kisikovih radikalov širokega spektra, ki je učinkovit proti hidroksilnim radikalom, superoksidu, singlet kisiku in peroksinitritu (Nishikimi, 1975; Bodannes in Chan, 1979; Machlin in Bendich, 1987; Cohen, 1994). Kljub temu, da redoks reakcije z askorbinsko kislino potekajo v vodnih fazah, lahko regenerira lipofilni α -tokoferol (vitamin E) ter tako zaustavi peroksidacijo celičnih membran (Kitts, 1997). V prisotnosti kovinskih ionov (Fe^{3+} , Cu^{3+}) pa deluje kot pro-oksidant. Fe^{3+} reducira v Fe^{2+} , ki reducira kisik v hidroksilni radikal (Fentonova reakcija), ki povzroča oksidativne poškodbe v celicah (Naidu, 2003; Carr in Frei, 1999).

2.7 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM

Dobro znano dejstvo je, da so mnoge biološke funkcije v večini ali vseh organizmih enake ter, da je nekatere od teh mnogo lažje raziskovati le v določenih organizmih. Na prvi pogled se pekovska kvasovka ne zdi najbolj primerna za raziskovanje bioaktivnih komponent namenjenih človeški uporabi. Kot enocelični organizem se ne zdi dovolj reprezentativna kompleksnosti človeka, katerega nekaj deset trilijonov celic pripada na stotine tipom celic, ki so organizirane v mnoga tkiva in organe (Sturgeon in sod., 2006). Poleg tega genom kvasovke vsebuje le 6000 genov (Goffeau in sod., 1996), medtem ko človeški genom sestavlja približno 25000 kodirajočih regij (Pennisi, 2003). Zaradi določenih prednosti, ki jih imajo nekateri organizmi, so se razvili tako imenovani modelni organizmi, ki raziskovalcem pri delu nudijo določene prednosti. Njihova uporabnost se povečuje s pogostostjo uporabe, ki prispeva k odkrivanju novih tehnik, genov ter ostalih pomembnih informacij. Modelni organizem je torej vrsta, ki je zaradi enostavnega razmnoževanja in vzdrževanja v laboratorijskih razmerah uporabljena v velikem številu različnih študij (Gromozova in Voychuk, 2007). Študije, v katerih so uporabili *S. cerevisiae* kot modelni organizem, so prispevale k razumevanju osnovnih celičnih procesov, kot so metabolizem proteinov (Hilt, 2004; Wolf, 2004), popravljalni mehanizmi DNA (Tsukuda in sod., 2005), celični cikel (Hartwell in Kastan, 1994) ter mnogih drugih.

2.7.1 Prednosti kvasovke *S. cerevisiae* kot modelnega organizma

Kvasovka je eden najenostavnejših evkariontskih mikroorganizmov in ima kot modelni organizem veliko prednosti. Gojimo jo lahko kot suspenzijo v tekočem mediju ali v obliki kolonij na trdnem gojišču, aerobno in anaerobno. Za rast potrebuje definirano, enostavno in poceni gojišče (Simon in Bedalov, 2004). S prilagajanjem okoljskih parametrov lahko učinkovito in uspešno kontroliramo njeno rast in razmnoževanje. Ima kratek podvojevalni čas, ki traja le 90 minut. Zaradi naštetih lastnosti je njeno vzdrževanje enostavno in poceni (Menacho-Márquez in Margaía, 2007).

Kvasovka *S. cerevisiae* je bila prvi evkariontski organizem, katerega genom so v celoti sekvenirali. Obsežna anotacija genov in proteinov je shranjena v različnih podatkovnih bazah (Goffeau in sod., 1996). Stabilna je tako v haploidni kot diploidni obliki. Njen haploidni genom je zapakiran v 16 dobro poznanih kromosomih (Menacho-Márquez in Margaía, 2007). Za *S. cerevisiae* je značilna enostavna genska manipulacija, ki omogoča vstavitev, spremembo ali odstranitev genov (Sherman, 1991). Prav tako je primerna za izražanje humanih genov ter genov drugih evkariontov (Simon in Bedalov, 2004). Študije so pokazale, da ima 40 % proteinov kvasovk aminokislinska zaporedja, ki so slična vsaj enemu proteinu človeka. 30 % človeških proteinov, ki so vpleteni v nastanek bolezni pa ima ortologne gene v kvasovkah (Parsons in sod., 2003; Foury, 1997).

2.7.2 Kvasovka *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti kot modelni organizem

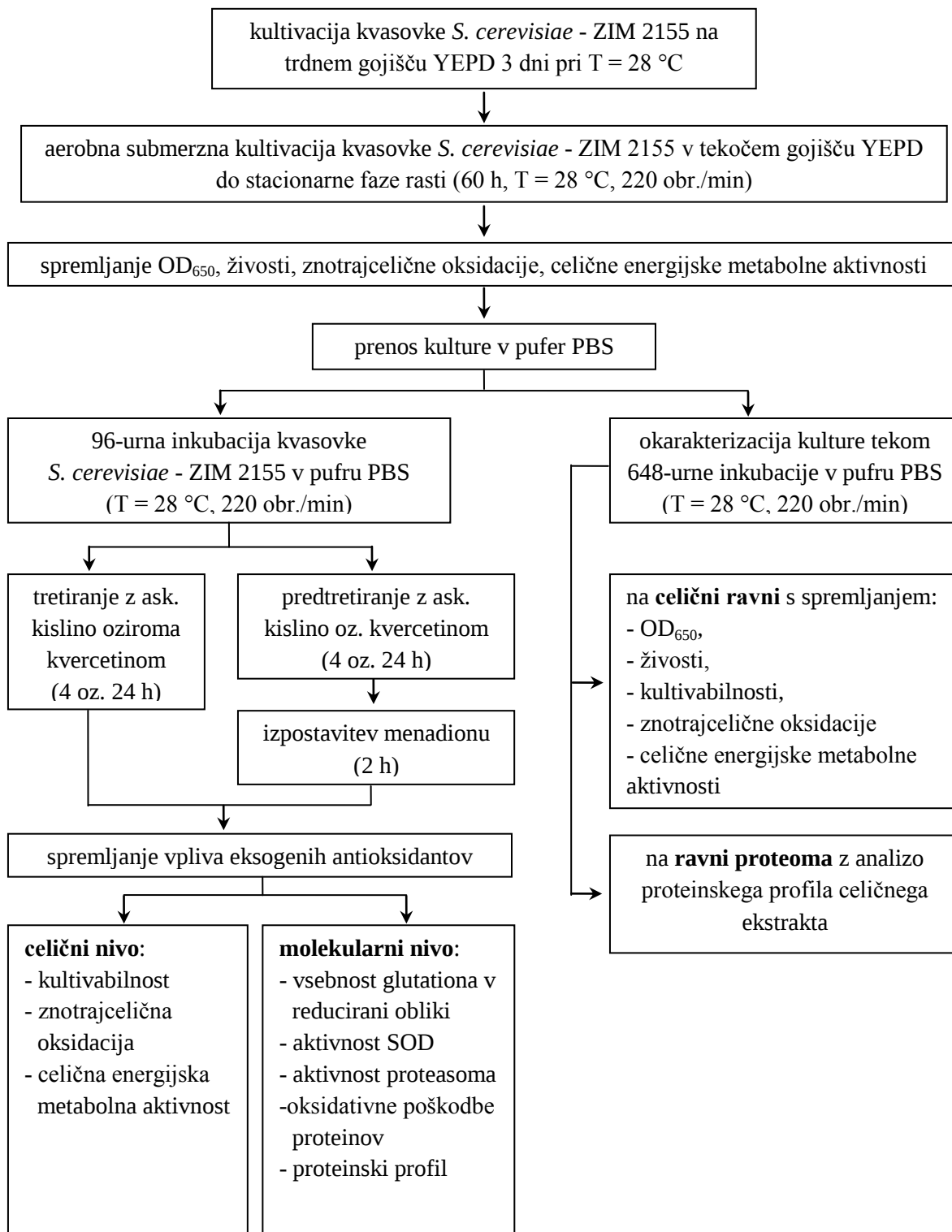
Ohranjanje živosti je posameznim celicam in organizmom omogočeno, če preživijo ne le v idealnem okolju temveč tudi v pogojih pomanjkanja. Ko okoliščine niso primerne za razmnoževanje, mnoge celice vstopijo v nedeleče stanje oz. fazo mirovanja (G_0 fazo), v kateri ohranijo sposobnost ponovnega vstopa v proliferativni celični cikel. Celice kvasovke *S. cerevisiae* v stacionarno fazo rasti oziroma v G_0 fazo vstopijo, ko v bogatem gojišču izčrpajo vir glukoze (Lillie in Pringle, 1980). Tako kot večina celic oz. mikroorganizmov, tudi kvasovke večino življenjske dobe preživijo v reverzibilni G_0 fazi. Pri mikroorganizmih vstop v G_0 fazo prvenstveno sproži pomanjkanje osnovnih hranil, medtem ko je pri večceličnih evkariontih vstop reguliran s hormoni in rastnimi faktorji (Werner-Washburne in sod., 1993; Lewis, 2000).

Ker se večina celic človeških tkiv in organov (kot npr. nevroni in skeletne mišice) ne razmnožuje in je večino časa v G_0 fazi (Yanagida, 2009), je za študij evkariontov kvasovka v stacionarni fazi rasti ustrezen modelni organizem. Poleg G_0 faze je tem celicam skupnih mnogo lastnosti, med najpomembnejšimi pa je respiratorni metabolizem, iz katerega pridobijo večino energije (Longo in sod., 1996).

Za študij oksidativnih poškodb in staranja je *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti primerna tudi zato, ker se tudi v mirujočih evkariontskih celicah poškodbe tekom časa kopičijo in ker imajo kvasovke enake mehanizme obrambe kot višji evkarionti (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Gralla in Kosman, 1992; Sigler in sod., 1999).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 6: Shema poteka dela

Figure 6: Flow chart

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete. Za poskuse smo uporabljali tri dni staro kulturo, ki smo jo vzdrževali v petrijevih ploščah s trdnim gojiščem YEPD na 28 °C.

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Trdno gojišče YEPD

Trdno gojišče YEPD smo uporabljali za precepljanje in vzdrževanje kulture ter določanje živosti kvasovk.

Preglednica 3: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993).

Table 3: Composition of solid YEPD medium (Atlas and Lawrence, 1993).

sestavina	količina (g)	končna koncentracija (w/v)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0	1 %
pepton (Biolife)	20,0	2 %
glukoza (Merck)	20,0	2 %
agar (Biolife)	20,0	2 %
dodamo dH ₂ O do 1000 mL		

Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Gojišče smo ohladili na 45 °C ter ga razlili v sterilne petrijeve plošče.

3.2.2.2 Tekoče gojišče YEPD

Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993).

Table 4: Composition of liquid YEPD medium (Atlas and Lawrence, 1993).

sestavina	količina (g)	končna koncentracija (w/v)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0	1 %
pepton (Biolife)	20,0	2 %
glukoza (Merck)	20,0	2 %
dodamo dH ₂ O do 1000 mL		

Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.3 Raztopine in reagenti

3.2.3.1 Inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- pufer PBS

Pufer PBS smo uporabljali za vzdrževanje kulture v stacionarni fazi.

Preglednica 5: Sestava pufra PBS.

Table 5: Composition of PBS buffer.

sestava 1 tablete (Oxoid)	količina (g)	končna koncentracija (w/v)
NaCl	8,0	8 %
KCl	0,2	0,2 %
Na ₂ HPO ₄	1,15	1,15 %
KH ₂ PO ₄	0,2	0,2 %
tableto raztopimo v 100 mL ddH ₂ O		

Pufer smo sterilizirali z avtoklaviranjem 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.3.2 Izpostavitve celic kvasovk antioksidantom

- Askorbinska kislina

Preglednica 6: Priprava 1 M založne raztopine askorbinske kisline.

Table 6: Preparation of 1 M ascorbic acid stock solution.

sestavina	količina	končna koncentracija
askorbinska kislina (Merck)	1,76 g	1 M
filtrirana ddH ₂ O do 10 mL		

Uporabili smo sveže pripravljeno založno raztopino askorbinske kisline.

- Kvercetin

Preglednica 7: Priprava 5 mM založne raztopine kvercetina.

Table 7: Preparation of 5 mM quercetion stock solution.

sestavina	količina	končna koncentracija
kvercetin (Sigma-Aldrich)	0,015 g	5 mM
80 % etanol do 10 mL		

Preglednica 8: Priprava 80 % etanola.

Table 8: Preparation of 80 % ethanol.

sestavina	količina	končna koncentracija (v/v)
96 % etanol	83,3 mL	80 %
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

Iz založne raztopine kvercetina smo pripravili 2 mL alikvote in jih hranili na -20 °C. Pred uporabo smo alikvote segreli na sobno temperaturo.

3.2.3.3 Izpostavitve celic kvasovk induktorju oksidativnega stresa

- menadion

Preglednica 9: Priprava 1M založne raztopine menadiona.

Table 9: Preparation of 1M menadione stock solution.

sestavina	količina	končna koncentracija
menadion (Sigma Aldrich)	2,76 g	1 M
filtrirana ddH ₂ O do 10 mL		

Uporabili smo sveže pripravljeno založno raztopino menadiona.

3.2.3.4 Določanje živosti kvasovk

3.2.3.4.1 Določanje živosti preko integritete membrane

- komplet "LIVE/DEAD[®] Funga Light[™] Yeast Viability Kit" (Molecular Probes) je vseboval:
barvilo SYTO[®] 9: 3,34 mM raztopina v DMSO
barvilo Propidium iodide: 20 mM raztopina v DMSO

Komplet smo hranili na -20 °C ter ga pred uporabo segreli na sobno temperaturo.

- pufer PBS (Preglednica 5)

Za spiranje kulture oz. suspenzije celic smo uporabili pufer PBS, ki smo ga sterilizirali s filtriranjem preko sterilnega membranskega filtra z velikostjo por 0,2 µm (Sartorius).

3.2.3.4.2 Določanje živosti s štetjem CFU (colony forming units)

- pufer PBS (Preglednica 5)

Za pripravo razredčitev po Kochu smo uporabili pufer PBS, ki smo ga sterilizirali s filtriranjem preko sterilnega membranskega filtra z velikostjo por 0,2 µm (Sartorius).

- trdno gojišče YEPD (Preglednica 3)

Ustrezne razredčitve po Kochu smo nacepili na gojišča v treh ponovitvah.

3.2.3.5 Ocena znotrajcelične oksidacije

- Kalijev fosfatni pufer (pH = 7,8)

Preglednica 10: Priprava 50 mM K₂HPO₄.

Table 10: Preparation of 50 mM K₂HPO₄.

sestavina	količina (g)	končna koncentracija
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,35	50 mM
dodamo dH ₂ O do 500 mL		

Preglednica 11: Priprava 50 mM KH₂PO₄.

Table 11: Preparation of 50 mM KH₂PO₄.

sestavina	količina (g)	končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	3,4	50 mM
dodamo dH ₂ O do 500 mL		

Kalijev fosfatni pufer s koncentracijo 50 mM smo pripravili tako, da smo bazičnemu 50 mM kalijevemu hidrogenfosfatu (preglednica 10) dodajali kisli 50 mM kalijev dihidrogenfosfat (preglednica 11) dokler se pH ni znižal do 7,8. Pufer smo sterilizirali z 20 min avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Pred uporabo smo pufer filtrirali preko sterilnega membranskega filtra z velikostjo por 0,2 µm (Sartorius).

- 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA)

Preglednica 12: Sestavine za pripravo 1 mM založne raztopine H₂DCFDA.

Table 12: Components for 1mM H₂DCFDA stock solution preparation.

sestavina	količina	končna koncentracija
H ₂ DCFDA (Sigma-Aldrich)	0,0049 g	1 mM
96 % etanol (Merck) do 10 mL		

Uporabili smo sveže pripravljeno založno raztopino H₂DCFDA.

3.2.3.6 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

- Komplet BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" (Promega).

Alikvot rekonstituiranega reagenta (pufer + substrat) smo shranjevali pri -80 °C ter ga 15 minut pred uporabo segreli na sobno temperaturo.

3.2.3.7 Priprava celičnega ekstrakta kvasovk

3.2.3.7.1 Celični ekstrakt za merjenje aktivnosti totalne superoksid dismutaze

- 0,1 M Tris HCl pufer (pH = 7,4) z 0,5 % TritonX-100, 5 mM DTT in inhibitorjem proteaz (IP)

Zatehtali smo 1,21 g Tris baze (Merck) ter dodali 75 mL ddH₂O. S koncentrirano kislino HCl smo uravnali pH na 7,4 ter dodali ddH₂O do 100 mL. Tako pripravljenemu pufru smo dodali 500 µL TritonX-100 (0,5 % (v/v)). Pufer smo hranili pri T = 4 °C.

Tik pred uporabo smo 2 mL pufru dodali 1,54 mg ditiotreitola (DTT; Sigma) ter pol tablete inhibitorjev proteaz (Complete mini, Roche Diagnostics).

- cirkonij-kremenčeve kroglice premera 0,5 mm (Biospec products)

3.2.3.7.2 Celični ekstrakt za merjenje aktivnosti proteasoma

- pufer PBS (Preglednica 5)
- cirkonij-kremenčeve kroglice premera 0,5 mm (Biospec products)

3.2.3.8 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze

- komplet "Superoxide dismutase (SOD) Activity Assay Kit"

Komplet "Superoxide dismutase (SOD) Activity Assay Kit" (BioVision) je vseboval:

- založno raztopino substrata WST-1
((2-4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolij, mononatrijeva sol)
Pred uporabo smo pripravili delovno raztopino substrata WST-1 (20-krat razredčeno založno raztopino WST-1 s testnim SOD pufrom).
- založno raztopino encima ksantin oksidaze
Pred uporabo smo pripravili delovno raztopino encima (v razmerju 1:167 razredčeno založno raztopino encima z razredčitvenim SOD pufrom).
- razredčitveni SOD pufer
- testni SOD pufer

Komplet smo hranili na 4 °C.

3.2.3.9 Določanje aktivnosti proteasoma

- komplet "Proteasome Activity Assay Kit"

Komplet "Proteasome Activity Assay Kit" (BioVision) je vseboval:

- substrat proteasoma
Raztopino z AMC označenih peptidov v DMSO smo segreli na 37 °C ter pripravili 10-μL alikvote. Alikvote smo shranjevali v temi na -20 °C.
- inhibitor proteasoma
Raztopino specifičnega inhibitorja proteasoma MG-132 v DMSO smo segreli na 37 °C ter pripravili 10-μL alikvote. Alikvote smo shranjevali v temi na -20 °C.
- AMC standard (0,1 mM v DMSO)
Raztopino AMC standarda smo segreli na 37 °C in pripravili 10-μL alikvote. Alikvote smo shranjevali v temi na -20 °C.

- pozitivno kontrolo
Liofiliziran lizat Jurkat celic z močno proteasomsko aktivnostjo smo raztopili v 100 μL ddH₂O ter alikvote hranili na -80 °C.
- testni pufer
Alikvote pufra (1 mL) smo hranili na -20 °C.

3.2.3.10 Določanje vsebnosti glutathiona

- komplet "Glutathione Assay Kit (GSH, GSSG and Total)"

Vsebnost reducirane in oksidirane oblike ter celokupnega glutathiona smo določali s kompletom "Glutathione Assay Kit (GSH, GSSG and Total)", ki je vseboval:

- testni pufer
Po prvi uporabi kompleta smo pripravili 1-mL alikvote pufra.
- 6 N perklorno kislino (PCA)
- 3 N kalijev hidroksid (KOH)
- založno raztopino o-ftalaldehida (OPA)
Delovno raztopino reagenta OPA smo pripravili z razredčitvijo 0,2 mL založne raztopine v 850 μL ddH₂O.
- GSH reducent
Pred prvo uporabo smo GSH reducent raztopili v 1,05 mL ddH₂O.
- založno raztopino GSH dušilca
Delovno raztopino GSH dušilca smo pripravili z razredčitvijo 20 μL založne raztopine v 1,05 mL ddH₂O.
- GSH standard
Založno raztopino smo pripravili tako, da smo 1 mg GSH standarda raztopili v 45 μL ddH₂O ter dodali 5 μL PCA za stabilizacijo.

Vse komponente kompleta smo shranjevali na -20 °C v temi.

3.2.3.11 Ekstrakcija celokupnih proteinov

- ekstrakcijski pufer (EP)

Preglednica 13: Sestavine za pripravo ekstrakcijskega pufra (EP).

Table 13: Components for extraction buffer preparation.

sestavina	količina	končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	1,0 g	4 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

Alikvote ekstrakcijskega pufra (2 mL) smo hranili na -20 °C. Pred uporabo smo EP odtajali na sobni temperaturi ter ga prelili v novo mikrocentrifugirko v katero smo pred tem odtehtali 0,02 g ditiotreitola (DTT; Sigma), tako da je bila končna koncentracija DTT 65 mM. Ko se je DTT raztopil smo dodali še pol tablete inhibitorja proteaz (Complete mini, Roche Diagnostics).

3.2.3.12 Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov

- komplet "ProteoExtract[®] Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit"

Komplet "ProteoExtract[®] Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit" (Calbiochem) je vseboval:

- 1x mitohondrijski ekstrakcijski pufer (MP),
- 5x citosolni ekstrakcijski pufer (CP),
- 1 M raztopino DTT in
- 500x raztopino IP.

3.2.3.13 Priprava ekstraktov za detekcijo oksidativnih poškodb na poliakrilamidnem gelu

- Alexa Fluor[®] 488 hydroxylamine

Založno raztopino barvila Alexa Fluor[®] 488 s koncentracijo 2 µg/µL smo pripravili tako, da smo 1 mg barvila raztopili v 500 µL DMSO ter alikvotirali po 10 µL. Alikvote smo hranili na temperaturi -20 °C.

3.2.3.14 Določanje proteinov

3.2.3.14.1 Določanje vsebnosti skupnih proteinov v biomasi

- CuSO₄ x 5H₂O

Preglednica 14: Priprava 2,5 % CuSO₄ x 5H₂O.

Table 14: Preparation of 2,5 % CuSO₄ x 5H₂O.

sestavina	količina (g)	končna koncentracija
CuSO ₄ x 5H ₂ O (Merck)	2,5	2,5 %
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

- NaOH

Preglednica 15: Priprava 3 M NaOH.

Table 15: Preparation of 3M NaOH.

sestavina	količina (g)	končna koncentracija
NaOH (Merck)	12,003	3 M
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

- goveji serumski albumin (BSA) (Sigma)

3.2.3.14.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

- NaCl

Preglednica 16: Sestavine za pripravo 0,15 M NaCl.

Table 16: Components for 0,15 M NaCl preparation.

sestavina	količina (g)	končna koncentracija
NaCl (Merck)	0,877	0,15 M
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

- goveji serumski albumin (BSA) (Sigma)

3.2.3.15 2-D elektroforeza

3.2.3.15.1 Izoelektrično fokusiranje (IEF)-prva dimenzija

- raztopina za rehidracijo IPG trakov

Preglednica 17: Sestavine za pripravo rehidracijskega pufra (RP).

Table 17: Components for rehydration buffer preparation.

sestavine	količina	končna koncentracija
urea (Sigma-Aldrich)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma-Aldrich)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	0,5 g	2 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
bromfenol modro (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

Alikvote rehidracijskega pufra (2 mL) smo hranili na -20 °C (do 6 mesecev). Pred uporabo smo pufer odtajali na sobni temperaturi ter ga prelili v novo mikrocentrifugirko v katero smo pred tem odtehtali 0,006 g ditiotreitol (DTT; Sigma), tako, da je bila končna koncentracija DTT 18 mM.

- mineralno olje (Sigma)
- trakovi z imobiliziranim pH gradientom-IPG trakovi (pH 3-10 ali 4-7, dolžina 13 cm) (GE Healthcare)

3.2.3.15.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

- pufer za uravnoteženje-osnovni

Preglednica 18: Sestavine za pripravo osnovnega pufra za uravnoteženje.

Table 18: Components for equilibration buffer-base preparation.

sestavina	količina	končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl (pH = 8,8)	25,0 mL	75 mM
urea (Sigma)	180,0 g	6 M
glicerol (Sigma)	150,0 mL	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	10,0 g	2 % (w/v)
bromfenol modro (BFM) (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 500 mL		

Osnovni pufer za uravnoteženje smo alikvotirali po 40 mL ter ga hranili pri -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi ter pripravili pufer za uravnoteženje I in II.

Pufer za uravnoteženje I smo pripravili tako, da smo 0,2 g DTT raztopili v 20 mL osnovnega pufra za uravnoteženje. Pufer za uravnoteženje II smo pripravili tako, da smo 0,96 g jodacetamida raztopili v 20 mL osnovnega pufra za uravnoteženje. 20 mL pufra za uravnoteženje zadostuje za uravnoteženje dveh IPG trakov.

- SDS elektroforezni pufer

Preglednica 19: Priprava 5x SDS elektroforeznega pufra.

Table 19: Preparation of 5x SDS electrophoresis buffer.

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 ddH ₂ O do 1000 mL		

Preglednica 20: Priprava 1x SDS elektroforeznega pufra.

Table 20: Preparation of 1x SDS electrophoresis buffer.

sestavina	količina	končna koncentracija
Tris baza (Sigma)	3,0 g	52 mM
glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

- raztopine za pripravo ločilnega gela

Preglednica 21: Priprava 1,5 M raztopine Tris-HCl (pH = 8,8).

Table 21: Preparation of 1,5 M Tris-HCl solution (pH = 8,8).

Tris-baza (Sigma)	72,6 g
ddH ₂ O	do 300 mL
koncentrirana HCl	do pH = 8,8
ddH ₂ O	do 400 mL

Raztopino Tris-HCl hranimo 3 mesece pri T = 4 °C v temi.

Preglednica 22: Priprava 10 % (w/v) raztopine SDS.

Table 22: Preparation of 10 % (w/v) SDS solution.

SDS (Sigma)	10,0 g
ddH ₂ O do 100 mL	

Raztopino SDS hranimo 6 mesecev pri sobni temperaturi.

Preglednica 23: Priprava 10 % (w/v) raztopine APS.

Table 23: Preparation of 10 % (w/v) APS solution.

APS (Sigma)	0,1 g
dodamo ddH ₂ O do 1 mL	

Raztopino APS pripravimo tik pred uporabo ali svežo raztopino alikotoviramo ter hranimo pri T = - 20 °C.

Preglednica 24: Priprava ločevalnega gela debeline 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida.

Table 24: Preparation of 1-mm thick running gel with 12 % (w/v) acrylamide concentration.

sestavina	količina za 2 gela	količina za 4 gele
akrilamid 30 % (w/v) / bisakrilamid 0,8 % (w/v)	15,7 mL	31,4 mL
1,5 M raztopina Tris-HCl (pH = 8,8)	9,8 mL	19,6 mL
10 % raztopina SDS	0,4 mL	0,8 mL
ddH ₂ O	13 mL	26 mL
10 % raztopina APS	195 µL	390 µL
TEMED	13 µL	26 µL

Raztopino APS in TEMED smo ostalim sestavinam dodali po 10 minutnem razplinjevanju v ultrazvočni kopeli.

- agaroza raztopina

Preglednica 25: Sestavine za pripravo 0,5 % agarozne raztopine.

Table 25: Components for 0,5 % agarose solution.

sestavina	količina	končna koncentracija
agaroza (Sigma)	0,5 g	0,5 % (w/v)
1x SDS elektroforezni pufer	100 mL	
BFM	1 kristalček	

Mešanico agaroze in bromfenol modrega v SDS elektroforeznem pufru smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je agaroza raztopila. Raztopino smo alikvotirali in jo hranili en mesec na sobni temperaturi.

3.2.3.15.3 Barvanje gelov

- fiksacijska raztopina

Preglednica 26: Sestavine za pripravo fiksacijske raztopine.

Table 26: Components for fix solution preparation.

sestavina	količina	končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	500 mL	50 % (v/v)
100 % očetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

- barvilo Sypro Ruby (Invitrogen)
- raztopina za razbarvanje

Preglednica 27: Sestavine za pripravo raztopine za razbarvanje.

Table 27: Components for wash solution preparation.

sestavina	količina	končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	100 mL	10 % (v/v)
100 % očetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

3.2.4 Laboratorijska oprema

3.2.4.1 Priprava gojišč, raztopin in reagentov

- tehtnica Sartorius excellence
- tehtnica PS 1200/C/2 (Radwag)
- avtoklav Sutjeska
- magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica Železniki)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- pH meter Seven multi (Mettler Toledo)
- petrijeve plošče (Golias)
- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)

3.2.4.2 Inokulacija, kultivacija in inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- inkubator IG 150 (Jouan)
- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- mikroskop ATC 200 (Leica)

- spektrofotometer MA 9150 (Iskra)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- centrifuga 322A (Tehtnica)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- 1000-mL erlenmajerice s stransko roko in enim utorom (Shot Duran)
- 100-mL erlenmajerice s stransko roko in enim utorom (Borosilicat)
- 500-mL erlenmajerice s stransko roko (Simex)
- penasti zamaški (Daibo)
- cepilna zanka (Golias)
- 100-mL merilni valj
- 50-mL merilni valj
- infuzijske steklenice (Duran)
- avtoklavirni trak
- aluminijasta folija

3.2.4.3 Pridobitev biomase (vzorcev) za analize

- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- centrifuga 322A (Tehtnica)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- avtomatske pipete Biohit
- 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- 50-mL falkonke (TPP)

3.2.4.4 Določanje živosti kvasovk

- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- avtomatske pipete Biohit
- 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- inkubator I-50 (Kambič)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan
- črne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)

3.2.4.5 Ocena znotrajcelične oksidacije

- 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- avtomatske pipete Biohit
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- črne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.4.6 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

- avtomatske pipete Biohit
- multikanalna pipeta (Eppendorf)
- rezervoar za multikanalno pipeto (Eppendorf)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- bele 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.4.7 Priprava celičnega ekstrakta kvasovk

- 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- avtomatske pipete Biohit
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- cirkonij-kremenčeve kroglice premera 0,5 mm (Biospec products)
- homogenizator Bullet Blender Storm (24x1,5 mL) (Next Advance, Inc.)
- 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- trak Parafilm® Sealing Film

3.2.4.8 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze

- avtomatske pipete Biohit
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- prozorne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)

- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.4.9 Določanje aktivnosti proteasoma

- avtomatske pipete Biohit
- vrtnik TTS2 (Ika)
- bele 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.4.10 Določanje vsebnosti glutationa

- 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- avtomatske pipete Biohit
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- črne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.4.11 Ekstrakcija proteinov

- 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- avtomatske pipete Biohit
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- cirkonij-kremenčeve kroglice premera 0,5 mm (Biospec products)
- homogenizator Bullet Blender Storm (24x1,5 mL) (Next Advance, Inc.)
- 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- trak Parafilm® Sealing Film

3.2.4.12 Določanje proteinov

Določanje vsebnosti skupnih proteinov v biomasi

- 2-mL mikrocentrifugirke s pokrovčki (Sarstedt)
- avtomatske pipete Biohit
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- vrtnik TTS2 (Ika)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- prozorne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

Določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

- 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- avtomatske pipete Biohit
- vrtnik TTS2 (Ika)
- prozorne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.4.13 2-D elektroforeza

Izoelektrično fokusiranje

- avtomatske pipete Biohit
- vrtnik TTS2 (Ika)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- Multiphore II elektroforetska enota (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (Pharmacia Biotech)
- plastična plošča z vdolbinami
- elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- elektrodi (anoda in katoda) (Pharmacia Biotech)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- papirnate krpe

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

- steklene plošče (16x18 cm)
- papirnati robčki
- distančniki (1 mm)
- nosilci z vijaki
- nosilci
- stiščki
- fen
- epruvete z zamaški
- ultrazvočna kopel (Sonis-Pio)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- zgornja SDS-PAGE posoda z elektrodami (GE Healthcare)
- spodnja SDS-PAGE posoda z elektrodami (GE Healthcare)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- stresalna plošča (Biometra)
- plastične posode velikosti 19,5 x 20,8 cm (Rotho)

3.2.4.14 Detekcija slike in analiza gelov

- stresalna plošča (Biometra)
- plastične posode velikosti 19,5 x 20,8 cm (Rotho)
- CAM-GX-CHEMI-HRA16 sistem za dokumentacijo gelov (Syngene)
- GeneSnap računalniški program za slikanje gelov (Syngene)
- 2-D Dymension računalniški program za obdelavo gelov (Syngene)

3.2.4.15 Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje vzorcev, raztopin, reagentov in kompletov

- zamrzovalna omara -20 °C (LTH)
- zamrzovalna omara -80 °C (LTH)
- hladilnik (LTH)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti

Za precepljanje in vzdrževanje kulture *Saccharomyces cerevisiae* smo uporabili trdno gojišče YEPD (Preglednica 3), za aerobno submerzno namnoževanje biomase kvasovk smo uporabili tekoče gojišče YEPD (Preglednica 4), medtem ko smo za vzdrževanje kulture v stacionarni fazi rasti uporabili pufer PBS (Preglednica 5).

3.3.1.1 Inokulacija in kultivacija

Za inokulacijo smo uporabili tri dni staro kulturo *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) s trdnega gojišča YEPD. Kulturo smo s cepilno zanko postopoma nacepljali v 50 mL tekočega gojišča YEPD, dokler nismo dosegli optične gostote (OD) kulture približno 0,95. Uporabili smo erlenmajerico s stransko roko (Borosilicate, en utor), s pomočjo katere smo izmerili OD pri 650 nm. Nato smo 40 mL suspenzije celic prenesli v 360 mL tekočega YEPD v 1-L erlenmajerici s stransko roko (Shot Duran, en utor). Pred kultivacijo smo uspešnost inokulacije in natančnost redčitve preverili s ponovnim merjenjem optične gostote. Kultivacija kvasovk je potekala 60 ur pri 28 °C in 220 obr./min, in sicer do stacionarne faze rasti ter koncentracije celic 5×10^8 celic/mL (Priloga A).

3.3.1.2 Prenos kulture v pufer PBS

Pred prenosom kulture v pufer PBS smo uspešnost kultivacije preverili z merjenjem OD₆₅₀ (~2,0). Nato smo 50 mL brozge kvasovk prelili v centrifugirko, jo centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min ter odlili supernatant. Sediment smo sprali s 50 mL pufra PBS, ogretega na 28 °C. Sprane celice smo resuspendirali v 50 mL PBS ter 40 mL prenesli v 500-mL erlenmajerico s stransko roko (Simex, en utor). Preneseni suspenziji celic smo dodali 160 mL pufra PBS, da smo dosegli koncentracijo 1×10^8 celic/mL. Sledila je inkubacija suspenzije kvasovk pri 28 °C in 220 obr./min. Inkubacija je potekala 96 ur.

3.3.2 Tretiranje kulture v stacionarni fazi rasti

Delovanje eksogenih antioksidantov smo preučevali z izpostavitvijo kulture izbranim antioksidantom ter z izpostavitvijo kulture antioksidantom, kateri je sledila še izpostavitvev induktorju oksidativnega stresa.

3.3.2.1 Izpostavitve celic eksogenim antioksidantom

Po 96 h inkubacije smo po 10 mL celične suspenzije prenesli v 50-mL centrifugirke ter dodali ustrezen volumen raztopine antioksidanta (Preglednica 28). Centrifugirke smo zatesnili s penastimi zamaški ter suspenzijo celic inkubirali 4 oziroma 24 ur na 28 °C pri 220 obr./min. Pri vsakem tretiranju smo imeli tudi kontrolni vzorec, ki ga je predstavljala kultura, ki ni bila izpostavljena raztopini antioksidanta. Po izteku inkubacije smo vpliv delovanja antioksidantov preverili na celičnem in molekularnem nivoju.

3.3.2.2 Izpostavitve celic eksogenim antioksidantom ter induktorju oksidativnega stresa

Po tretiranju z antioksidativnimi učinkovinami (4 oz. 24 ur) je sledilo dvo-urno tretiranje s 60 mM raztopino menadiona. Menadion (2-metil-1,4-naftokinon) je kinon, ki je v celicah vključen v redoks kroženje. Pri prejetju enega elektrona, katerega vir je največkrat mitohondrijska respiratorna veriga nastane radikal semikinona, ki se zaradi nestabilnosti ob prisotnosti kisika avtooksidira pri čemer se tvori superoksidni anion in kinon. Zaradi dismutacije in Fenton reakcije se iz $O_2^{\cdot-}$ tvori vodikov peroksid in hidroksilni radikal (De Groot in sod., 1985; Chung in sod., 1999). Vzorcem smo po končanem tretiranju z antioksidanti odstranili pufer PBS z antioksidativnimi učinkovinami, in sicer s spiranjem s pufrom PBS (filtriran, ogret na 28 °C). Kulturo smo resuspendirali v PBS ter dodali ustrezen volumen založne raztopine menadiona. Vzorce smo nato inkubirali s stresanjem pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C. Pri vsaki izpostavitvi celic smo imeli pozitivno in negativno kontrolo. Negativno kontrolo je predstavljala kultura, ki ni bila tretirana z antioksidanti ter namesto z mendionom tretirana z enakim volumnom pufru PBS, tako, da je koncentracija kvasnih celic ostala nespremenjena. Kot pozitivna kontrola nam je služila kultura, ki je bila izpostavljena le induktorju oksidativnega stresa, ne pa tudi antioksidantom. Po izteku inkubacije smo vpliv predtretiranja z antioksidanti preverili na celičnem in molekularnem nivoju.

Preglednica 28: Raztopine, uporabljene za tretiranje kulture v stacionarni fazi rasti.

Table 28: Solutions used for stationary phase culture treatment.

spojina	topilo	dodan ustrezen volumen založne raztopine	končna koncentracija v celični suspenziji
askorbinska kislina	ddH ₂ O	400 µL	40 mM
	ddH ₂ O	800 µL	80 mM
kvercetin	80 % etanol	335 µL	0,2 mM
	80 % etanol	837 µL	0,4 mM
menadion	ddH ₂ O	600 µL	60 mM

3.3.3 Ocena znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo smo določali po modificirani metodi, ki so jo opisal Jakubowski in sodelavci (2000). Metoda temelji na merjenju fluorescence oksidirane barvila 2',7'-diklorodihidrofluoresceina (H_2DCF). Celicam dodamo spojino v obliki diacetat estra (H_2DCFDA), ki zaradi svoje nepolarnosti prehaja preko membran celic. Znotraj celic ga nespecifične esteraze deacetilirajo do 2',7'-diklorodihidrofluoresceina (H_2DCF), ki je polaren, zato ostane ujet znotraj celic in ne prehaja membran. V celici postane tarča ROS, ki ga oksidirajo do diklorofluoresceina (DCF), ki fluorescira pri valovni dolžini 520 nm, če ga vzbujamo z valovno dolžino 488 nm.

Sprva so predpostavljali, da je 2',7'-diklorodihidrofluoresceina (H_2DCF) uporaben kot specifični indikator za H_2O_2 , nato pa so ugotovili, da oksidacijo H_2DCF povzročajo različne reaktivne zvrsti kot npr. $HO^\bullet$, $RO^\bullet$, $ROO^\bullet$ ter tudi reaktivne dušikove zvrsti ($NO^\bullet$ in $ONOO^-$) (Gomes in sod., 2005; Wang in Joseph, 1999; Crow, 1997). Oksidacija 2',7'-diklorodihidrofluoresceina z H_2O_2 je le indirektna reakcija, ki je odvisna od prisotnosti peroksidaz (LeBel in sod., 1992; Bonini in sod., 2006) ali Fe(II) (Royall in Ischiropoulos, 1993; Rothe in Valet, 1990). Za povečano koncentracijo DCF prisotnost reaktivnih zvrsti ni vedno potrebna. Lawrence in sod. (2003) so dokazali, da je citokrom c močan katalizator oksidacije H_2DCF in da povečane koncentracije citosolnega citokroma c povzročajo povečano fluorescenco brez sprememb reaktivnih zvrsti v celici. Zaradi mnogih dejavnikov, ki povzročajo oksidacijo diklorodihidrofluoresceina, se le ta uporablja za splošno oceno znotrajcelične oksidacije in ne za določanje posameznih zvrsti (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Oksidirana oblika diklorofluoresceina prehaja iz celic *Saccharomyces cerevisiae*, zato je fluorescenco možno meriti v ekstracelularnem mediju. Določitev zunajcelične koncentracije oksidirane oblike diklorofluoresceina z merjenjem fluorescence je merilo znotrajceličnega oksidacijskega stanja (Jakubowski in Bartosz, 1997).

Metodo detekcije znotrajcelične oksidacije v suspenziji celic s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč sta razvila Wang in Joseph (1999).

V 2-mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 2 mL kulture oziroma celične suspenzije, jo centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min ter odstranili supernatant. Sediment smo 3-krat sprali s filtriranim 50 mM kalijevim fosfatnim pufrom (pH 7,8) (Preglednici 10 in 11). Po tretjem spiranju smo odpipetirali ves supernatant in pelet dobro resuspendirali v 500 μ L kalij-fosfatnega pufra (pH 7,8). Iz 500 μ L resuspendirane kvasne suspenzije smo 100 μ L suspenzije prenesli v mikrocentrifugirko z 890 μ L kalij-fosfatnega pufra (pH 7,8), drugih 100 μ L pa v mikrocentrifugirko z 900 μ L kalij-fosfatnega pufra (pH 7,8) za merjenje OD pri 650 nm. Vzorce smo inkubirali 5 minut na 28 °C. Vzorcem s skupnim volumnom

990 μ L smo v temi dodali 10 μ L sveže pripravljene 1 mM raztopine H₂DCFDA (Preglednica 12). Nato smo vzorce inkubirali 15 min v temi na stresalniku pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce v štirih ponovitvah po 200 μ L nanesti na mikrotitrsko ploščico ter s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan) in programske opreme Magellan spremljali 2 h kinetiko fluoresciranja vzorcev pri vzbujevalni svetlobi 488 nm ter emisijski svetlobi valovne dolžine 520 nm. Rezultate smo predstavili kot intenziteto fluorescence normalizirano na vrednost OD (FI/OD₆₅₀) oziroma kot relativno intenziteto fluorescence glede na kontrolo-relativna fluorescenčna intenziteta (RFI).

3.3.4 Določanje živosti kvasovk

Živost kvasovk smo določali preko merjenja integritete membrane ter s štetjem CFU (colony forming units).

3.3.4.1 Določanje živosti preko integritete membrane

Viabilnost celic lahko merimo s spremljanjem bioloških faktorjev, ki se spremenijo z izgubo viabilnosti, kot na primer z merjenjem integritete oziroma prepustnosti membrane (Jepras in sod., 1995). Enostavno, zanesljivo in kvantitativno razlikovanje med mrtvimi in živimi celicami nam omogoča komercialni komplet "LIVE/DEAD[®] FungaLight[™] Yeast Viability Kit" (Molecular Probes, Invitrogen).

Komplet vsebuje barvili SYTO[®] 9 in propidijev jodid, ki se razlikujeta v spektralnih lastnostih in zmožnosti prehajanja preko celičnih membran. SYTO[®] 9 je zeleno fluorescentno barvilo, ki lahko prosto prehaja čez poškodovane in nepoškodovane celične membrane (Molecular Probes, 2005). Propidijev jodid (PJ) je rdeče fluorescenčno barvilo, katero zaradi svoje anionske narave ne more prehajati skozi vse celične membrane temveč le skozi poškodovane (Jernaes in Steen, 1994; Lopez-Amoros in sod., 1995; Comas in Vives-Rego, 1997; Williams in sod., 1998). V prisotnosti obeh barvil v celici, pride do fluorescenčnega resonančnega prenosa energije (ang. »fluorescence resonance energy transfer-FRET«) iz vzbujenih molekul SYTO[®] 9 barvila (donor) na molekule PJ (akceptor). Pri prenosu energije se zmanjša intenziteta fluorescence donorja (SYTO[®] 9) in poveča intenziteta fluorescence akceptorja (PJ). Za učinkovit FRET morata biti izpolnjena dva pogoja. Prvi pogoj je prekrivanje emisijskega spektra donorja ter ekscitacijskega spektra akceptorja. Drugi pogoj je ustrezna bližina akceptorja in donorja, ki je 1 do 10 nm (Horvath in sod., 2009; Maxfield, 2002).

V 1,5-mL mikrocentrifugirke Eppendorf smo odpipetirali 1 mL kulture oziroma celične suspenzije, jo centrifugirali 5 min pri 14 000 obr./min ter odstranili supernatant. Sediment

smo sprali v pufru PBS, nato pa iz izhodne suspenzije kvasovk s koncentracijo celic 10^8 /mL pripravili razredčitev s koncentracijo 10^6 celic/mL. Suspenziji smo dodali 1 μ L SYTO[®] 9 barvila ter takoj zatem še 1 μ L propidijevega jodida. Po 30-minutni inkubaciji v temi na 37 °C smo izmerili fluorescenco na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan) s programsko opremo Magellan v dveh korakih. V obeh korakih smo uporabili vzbujevalno svetlobo dolžine 488 nm. V prvi meritvi smo merili emisijsko svetlobo barvila SYTO[®] 9 pri 530 nm, v drugi, ki je sledila prvi pa smo merili oddano svetlobo barvila PJ pri 650 nm. Živost celic smo izrazili kot absolutne vrednosti fluorescence barvila SYTO[®] 9 normalizirane na optično gostoto celic (FI/OD₆₅₀).

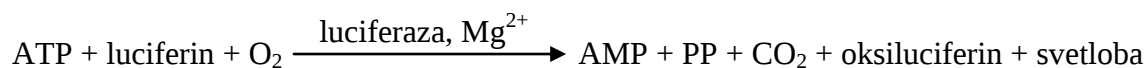
3.3.4.2 Določanje kultivabilnosti

S pomočjo CFU (colony forming units-število kolonijskih enot) določamo koncentracijo živih oziroma kultivabilnih celic. Kultivabilnost določimo s štetjem kolonij na trdnih ploščah in rezultat podamo kot število viabilnih celic na mililiter (CFU/mL). Ker je običajno koncentracija celic v izhodnih vzorcih prevelika, je potrebno pripraviti serijo razredčitev (Koch, 1994). Števne so tiste plošče, na katerih je število kolonij 30 do 300 (Breed in Dotterer, 1916).

3.3.5 Merjenje celične energijske metabolne aktivnosti

Celično energijsko metabolno aktivnost smo določali s pomočjo komercialnega kompleta "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay", ki smo ga pred uporabo pripravili po navodilih proizvajalca ter alikvote hranili na -80 °C. Celično energijsko metabolno aktivnost smo merili preko celokupnega razpoložljivega ATP, ki je premo sorazmeren z intenziteto oddane luminiscence. Metoda temelji na lizi celic ter tvorbi luminiscence s termostabilno luciferazo, katera ob prisotnosti kisika, Mg^{2+} in ATP katalizira monooksigenacijo luciferina v oksiluciferin pri čimer se del energije sprošča v obliki svetlobe (Promega, 2007).

Bioluminiscenčna reakcija:



V jamice mikrotitrskih ploščic namenjene merjenju luminiscence smo nanegli po 100 μ L kulture oziroma celične suspenzije ter dodali po 100 μ L odtajanega reagenta. Mikrotitrsko ploščico smo takoj prenesli v čitalec mikrotitrskih ploščic, premešali ter po 5 minutah

pomerili intenziteto oddane luminiscence. Rezultate smo izrazili kot intenziteto luminiscence normalizirano na vrednost OD (LI/OD₆₅₀) oziroma kot relativne vrednosti luminiscence glede na kontrolo - relativna luminiscenčna intenziteta (RLI).

3.3.6 Priprava celičnega ekstrakta kvasovk za določanje aktivnosti encimov

Po izpostavitvi celic antioksidantom (4 oz. 24 ur) in/ali induktorju oksidativnega stresa (2 uri) smo za vsak vzorec odvzeli dvakrat po 2 mL kulture, centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf), odstranili supernatant ter enega od dveh sedimentov resuspendirali v 250 µL PBS (Preglednica 5). Resuspendiran sediment smo združili s pripadajočim neresuspendiranim sedimentom ter mikrocentrifugirko sprali s pufrom PBS, da smo zagotovo prenesli vso biomaso. Po resuspendiranju smo združeno biomaso centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf), odstranili supernatant, pelet (iz 4 mL kulture) pa zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C do uporabe.

Tako pripravljene pelete smo uporabili tudi za določanje proteinov, le da smo pelete za določanje vsebnosti skupnih proteinov v biomasii shranjevali v hladilniku pri 4 °C.

3.3.6.1 Priprava celičnega ekstrakta za določanje aktivnosti proteasoma

Vzorci zamrznjeni na -80 °C smo odtajali na ledu in jim dodali eno žličko cirkonij-kremenčevih kroglic. Vzorcem smo dodali 200 µL pufru PBS (Preglednica 5). Nato smo celice s pomočjo homogenizatorja (Bullet Blender Storm, Next Advance, Inc.) homogenizirali 2 x 3 min pri hitrosti 8, z vmesno 5-minutno inkubacijo na ledu. Tako dobljeni homogenat smo centrifugirali pri 20000 g, 20 minut pri temperaturi 4 °C. V tako pripravljenih ekstraktih smo poleg aktivnosti proteasoma določali tudi koncentracijo proteinov.

3.3.6.2 Priprava celičnega ekstrakta za določanje aktivnosti superoksid dismutaze

Vzorci zamrznjeni na -80 °C smo odtajali na ledu in jim dodali eno žličko cirkonij-kremenčevih kroglic. Vzorcem smo dodali 200 µL 0,1 M Tris HCl pufru (pH = 7,4) z 0,5 % TritonX-100, 5 mM DTT ter inhibitorjem proteaz (IP). Nato smo celice s pomočjo homogenizatorja (Bullet Blender Storm, Next Advance, Inc.) homogenizirali 2 x 3 min pri hitrosti 8, z vmesno 5-minutno inkubacijo na ledu. Tako dobljeni homogenat smo centrifugirali pri 14000 g, 5 minut pri temperaturi 4 °C. V tako pripravljenih ekstraktih smo poleg aktivnosti superoksid dismutaze določali tudi koncentracijo proteinov.

3.3.7 Določanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze smo določali s pomočjo komercialnega kompleta "Superoxide dismutase (SOD) Activity Assay Kit" (Biovision).

Metoda temelji na dejstvu, da superoksid dismutaza ob prisotnosti superoksidnih anionov inhibira redukcijo WST-1. Vir superoksidnih anionov je reakcija, ki jo katalizira ksantin oksidaza. Le ta oksidira ksantin v sečno kislino in vodikov peroksid, pri tem pa se tvori superoksidni anion. Če je superoksid dismutaza prisotna, katalizira dismutacijo superoksidnega aniona v vodikov peroksid in molekularni kisik ter tako prepreči redukcijo WST-1 s superoksidnimi anioni. V kolikor superoksid dismutaza ni prisotna, potem se nastajajoči superoksidni anioni porabljajo v reakciji redukcije WST-1 v vodotopni formazan, ki je rumene barve. Tako je hitrost redukcije linearno sorazmerna z aktivnostjo ksantin oksidaze in je inhibirana s SOD (Biovision, 2011a).

Aktivnost superoksid dismutaze smo določali v sveže pripravljenih ekstraktih. Pred vsakim merjenjem smo pripravili delovno raztopino WST-1 raztopine ter encima. Za vsak vzorec in slepi vzorec 2 smo na mikrotitrsko ploščico nanesti 20 µL svežega ekstrakta. Za slepa vzorca 1 in 3 smo namesto ekstrakta nanesti 20 µL ddH₂O. Vsem vzorcem in slepim vzorcem smo nato dodali 200 µL delovne raztopine WST-1. Slepima vzorcema 2 in 3 smo dodali 20 µL razredčitvenega pufra, vzorcem in slepemu vzorcu 1 pa enako količino delovne raztopine ksantin oksidaze (Preglednica 29). Tako pripravljene reakcijske mešanice smo v mikrotitrski ploščici inkubirali 20 min na 37 °C, nato pa izmerili absorbanco pri 450 nm na čitalcu mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan) s programsko opremo Magellan ter izračunali specifično aktivnost superoksid dismutaze (aktivnost SOD (% inhibicije) / m_{proteinov}). Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti specifične aktivnosti glede na kontrolo.

$$\text{aktivnost SOD (\% inhibicije)} = \frac{(Aslepa1 - Aslepa3) - (Avzorec - Aslepa2)}{(Aslepa1 - Aslepa3)} * 100 \quad \dots (8)$$

Preglednica 29: Protokol določanja aktivnosti superoksid dismutaze.

Table 29: Protocol of superoxide dismutase activity determination.

	vzorec	slepi vzorec 1	slepi vzorec 2	slepi vzorec 3
ekstrakt (μL)	20	-	20	-
dd H₂O (μL)	-	20	-	20
WST-1 raztopina (μL)	200	200	200	200
razredčitveni pufer (μL)	-	-	20	20
raztopina encima (μL)	20	20	-	-

Slepa vzorca 2 in 3 potrebujemo zato, da odštejemo tisti del absorbance, ki jo prispevata vzorec in reagent. Slepi vzorec 1 je pozitivna kontrola, v kateri se zaradi odsotnosti superoksid dismutaze vsi nastali superoksidni anioni porabijo za redukcijo WST-1 v vodotopni formazan.

3.3.8 Določanje aktivnosti proteasoma

Aktivnost proteasoma smo določali s pomočjo komercialnega kompleta "Proteasome Activity Assay Kit" (Biovision).

Proteasomi so veliki proteinski kompleksi, ki se nahajajo v jedru in citoplazmi vseh evkariontov ter citoplazmi nekaterih prokariotov. 26S proteasom je od ATP odvisen proteolitični kompleks, ki ga sestavlja 20S proteolitično jedro ter en ali dva 19S regulatorna kompleksa (Baumeister in sod., 1998; Coux in sod., 1996; Voges in sod., 1999). Za izolacijo 26S proteasoma je potrebna prisotnost ATP in glicerola, ki vzdržujeta njegovo integriteto med izolacijo (Coux in sod., 1996). 20S jedro obstaja tudi kot samostojna enota, imenovana 20S proteasom, ki je veliko bolj stabilen in ga je lažje izolirati kot 26S proteasom. 20S proteasom prepozna in razgradi oksidirane in nepravilno zvite proteine neodvisno od ATP in ubikvitinilacije, zato je pomemben za hitro odstranitev poškodovanih proteinov, ki nastanejo med oksidativnim stresom (Shringarpure in sod., 2001; Jung in Grune 2008; Grune in sod., 2003; Poppek in Grune, 2006). 20S proteasom je sestavljen iz dveh alfa in beta obročev. Vsak obroč sestavlja 7 različnih podenot (α_{1-7} in β_{1-7}). Od vseh beta podenot imajo le tri katalitične aktivnosti. β -1 podenota ima kaspazno aktivnost in cepi vezi za kislimi aminokislinami (kot npr. glutaminska kislina). β -2 podenota ima tripsinsko aktivnost s katero cepi vezi za bazičnimi aminokislinami kot sta arginin in lizin. β -5 podenota s kimotripsinsko aktivnostjo cepi vezi za hidrofobnimi aminokislinami kot je fenilalanin (Coux in sod., 1996; Farout in Friguet, 2006; Friguet in sod., 2002). Centralna komponenta aktivnega centra podenot s katalitično aktivnostjo je treonin (Seemüller in sod., 1995). Hidroksilna skupina treonina na N-terminalnem koncu vrši nukleofilni napad na karbonilni ogljik v peptidni vezi. Zaradi nenavadnega

katalitičnega mehanizma, ki se razlikuje od mehanizma ostalih proteaz so beta podenote proteasoma uvrščene v Ntn (N-terminalne nukleofilne) hidrolaze (Brannigan in sod., 1995).

Za merjenje aktivnosti proteasoma se uporablja fluorogene sintetične peptidne substrate, ki omogočajo enostavno in natančno merjenje aktivnosti v ekstraktih in očiščenih frakcijah. Substrati so peptidi iz treh do štirih aminokislin, ki imajo na C-terminalnem koncu fluorofor. Proteasom cepi peptidno vez med aminokislino in fluoroforom, pri tem pa se sprost produkt, ki fluorescira. Največkrat se kot fluorofori uporabljajo 7-amido-4-metilkumarin (AMC), 2-naftilamin (NA) in 4-metoksi-2-naftilamin (MNA). Od vseh fluoroforov se največkrat uporablja AMC, ki najmočneje fluorescira (Kisselev in Goldberg, 2005). Za detekcijo treh katalitičnih aktivnosti proteasoma se uporabljajo peptidi iz različnih zaporedij aminokislin. Za detekcijo kimotripsinske aktivnosti se uporablja sukcinil-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-amc), za detekcijo tripsinske aktivnosti N-t-butiloksikarbonil-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC (Boc-LSTR-amc) ter za detekcijo kaspazne aktivnosti N-benziloksikarbonil-Leu-Leu-Glu-AMC (Z-LLE-amc) (Friguet in sod., 2002).

Aktivnost proteasoma smo merili preko kimotripsinske aktivnosti 20S proteasoma z detekcijo fluorescentnega AMC. Specifični inhibitor proteasoma MG-132, ki inhibira proteolitično aktivnost proteasoma, nam je omogočal razlikovanje aktivnosti proteasoma od ostalih proteaznih aktivnosti, ki so bile prisotne v vzorcih (Biovision, 2011b).

Aktivnost proteasoma smo določali v sveže pripravljenih ekstraktih. V jamice mikrotitrške ploščice smo v ponovitvi nanесли 2 μL vzorca. Vsem vzorcem in njihovim ponovitvam smo dodali 98 μL testnega pufru. Nato smo v eno od ponovitev dodali 1 μL inhibitorja proteasoma ter vsem ponovitvam 1 μL substrata (Preglednica 30). Mikrotitrsko ploščico smo prenesli v čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan) ter s programsko opremo Magellan pri 37 °C spremljali 60-minutno kinetiko pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 350 nm in emisijskem svetlobi pri 440 nm. Izmerjene intenzitete fluorescence so normalizirane na maso proteinov ter rezultati izraženi kot relativne specifične aktivnosti glede na kontrolo.

Preglednica 30: Protokol določanja aktivnosti proteasoma.

Table 30: Protocol of proteasome activity determination.

	celokupna proteazna aktivnost	neproteasomska aktivnost
vzorec (μL)	2	2
testni pufer (μL)	98	98
inhibitor proteasoma (μL)	-	1
substrat proteasoma (μL)	1	1

3.3.9 Določanje vsebnosti glutathiona

Vsebnost reducirane in oksidirane oblike ter celokupnega glutathiona smo določali s pomočjo komercialnega kompleta "Glutathione Assay Kit (GSH, GSSG and total)" (Biovision). S pomočjo kompleta smo določali reducirano (GSH) in oksidirano (GSSG) obliko glutathiona kot tudi celokupni glutathion. Komplet nudi edinstven postopek ter posebno sestavo pufra, ki preprečuje interferenco proteinskih tiolov ter stabilizira GSH in GSSG v raztopini. Metoda temelji na reakciji o-ftalaldehida (OPA) in glutathiona pri čemer nastane stabilni produkt z visoko intenziteto fluorescence. Reakcija omogoča specifično določanje reducirane oblike glutathiona. Za merjenje celokupnega glutathiona dodamo reductent, ki reducira GSSG v GSH. Z dodatkom GSH dušilca, ki odstrani GSH ter tako prepreči njegovo reakcijo z OPA pa lahko določamo tudi oksidirano obliko glutathiona (Biovision, 2011c).

Glutathion je glavni intracelularni nizkomolekularni tiol (tripeptid), ki igra ključno vlogo pri obrambi pred oksidativnim stresom tako v tkivih kot v celicah. Poleg glutathiona so sulfhidrilne skupine prisotne tudi v proteinih in peptidih, zato je potrebno najprej izvesti deproteinizacijo vzorca. Za odstranjevanje proteinov je na voljo več pristopov: acidifikacija, dodatek organskih topil ali ultrafiltracija. Od organskih topil se največkrat uporabljajo acetonitril, aceton in metanol. Slabost organskih topil je, da ne preprečijo avtooksidacije GSH, če tiolna skupina ni predhodno zaščitena (Smith in sod., 1995). Avtooksidacija GSH je ena od glavnih šibkih točk metod za določanje vsebnosti glutathiona. Neencimska oksidacija GSH se močno poveča pri pH, ki je večji od 7 (Luo in sod., 1995; Anderson in sod., 1997). Med potekom eksperimenta jo lahko omejimo s hranjenjem vzorcev na ledu (Camera in Picardo, 2002). Za deproteinizacijo vzorcev je veliko bolj primerna uporaba kisline, ker poleg deproteinizacije zniža tudi pH vzorca, zaradi česar se zmanjša neencimska oksidacija glutathiona. Za acidifikacijo so najbolj primerne 5-sulfosialična, trikloroacetna, trifluoroacetna, perklorna in metafosforna kislina (Ivanov in sod., 2000; Melnyk in sod., 1999; Muscari in sod., 1998; Davey in sod., 1997). Uporaba perklorne kisline ima prednost pred drugimi, saj jo lahko enostavno odstranimo z obarjanjem pri nevtralnem pH in tako ne moti nadaljnjega postopka določanja glutathiona (Akerboom in Sies, 1981). Čeprav je precipitacija proteinov z acidifikacijo najbolj učinkovita ima tudi slabost. Pred derivatizacijo glutathiona z kromoforom ali fluoroforom je potrebno zvišati pH nad vrednost 9. Nevtralizacija vzorcev podaljša postopek določanja glutathiona (Yang in sod., 1995).

Za derivatizacijo glutathiona se najpogosteje uporabljajo fluorofori, ki reagirajo s tiolno skupino. Tovrstni fluorofori so selektivni in preprečujejo napačne rezultate zaradi avtooksidacije glutathiona med pripravo in analizo vzorcev. Tovrstna derivatizacija ne omogoča detekcije GSSG. Nasprotno pa fluorofori, ki reagirajo z aminoskupino peptidov omogočajo sočasno detekcijo GSH in GSSG, čeprav je le ta manj selektivna (Camera in

Picardo, 2002). Pogosto uporabljen fluorofor je o-ftalaldehid (OPA). OPA je nefluorescenten, dokler v prisotnosti tiola ne reagira kot heterobifunkcionalen reagent s primarnim aminom ter tako tvori triciklični izoindol (Molnar-Perl, 2001; Yan in Huxtable, 1995). Derivatizacija GSH z OPA je odvisna od pH-najvišji signal fluorescence je med pH 9, 5 in 12 (Parmentier in sod., 1998).

OPA je pogosto uporabljen reagent, in sicer zaradi mnogih izkušenj z njim ter zaradi blagih pogojev pod katerimi poteka reakcija (Paroni in sod., 1995; Cereser in sod., 2001).

Vsebnost glutathiona smo določali po navodilih proizvajalca, z manjšimi spremembami. Sediment iz 4-mL kulture smo resuspendirali v 200 μ L ledeno hladnega GSH testnega pufru. Po 5 minutni inkubaciji na ledu, smo 60 μ L celične suspenzije prenesli v predhodno ohlajene mikrocentrifugirke z 20 μ L 6 N perklorne kisline (PCA), suspenzijo premešali na vrtniku ter ponovno inkubirali na ledu 5 minut. Vzorce smo nato centrifugirali pri 13000 g, 2 minuti in 4 °C. Po centrifugiranju smo 40 μ L supernatanta nevtralizirali z 20 μ L ledeno hladnega 3 M KOH. Nevtralizacija je potekala 5 minut na ledu, temu je sledilo 2 minutno centrifugiranje vzorcev pri 13000 g in 4 °C. Vzorce smo nato nanesti na mikrotitrsko ploščico za merjenje fluorescence ter jim dodali ustrezne reagente.

Glede na to, katero obliko glutathiona smo določali, smo v mikrotitrsko ploščico dodali različne volumne vzorcev ter reagentov (preglednica 31):

- za določanje GSH smo na mikrotitrsko ploščico nanesti 10 μ L vzorca ter mu dodali 80 μ L GSH testnega pufru;
- za določanje GSSG smo 1 μ L vzorca dodali 69 μ L GSH testnega pufru ter 10 μ L dušilca. Mikrotitrsko ploščico smo 15 sekund stresali pri 600 obr./min ter inkubirali 10 minut na 25 °C, nato pa dodali še 10 μ L reducenta ter ponovili postopek stresanja in inkubacije.
- za določanje celokupnega glutathiona smo na mikrotitrsko ploščico nanesti 1 μ L vzorca, mu dodali 79 μ L GSH testnega pufru ter 10 μ L reducenta. Mikrotitrsko ploščico smo 15 sekund stresali pri 600 obr./min ter inkubirali 10 minut na 25 °C.

Po končanih inkubacijah smo vsem ponovitvam in vzorcem dodali 10 μ L reagenta OPA, dobro premešali (15 s pri 600 obr./min) ter reakcijske mešanice v mikrotitrski ploščici inkubirali 40 minut pri 25 °C. S čitalcem mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan) ter programsko opremo Magellan smo izmerili intenziteto fluorescence pri svetlobi valovne dolžine 420 nm.

Količino glutationa ($\mu\text{g}/\text{jamico}$) smo odčitali iz umeritvene krivulje ter vsebnost glutationa v reducirani obliki izrazili kot $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ skupnih proteinov (priloga B). Rezultati so izraženi kot relativna vsebnost glutationa v reducirani obliki glede na kontrolo.

Za umeritveno krivuljo smo uporabili založno raztopino GSH standarda s koncentracijo $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Preglednica 31: Protokol določanja glutationa.

Table 31: Protocol of glutathione determination.

	določanje reducirane oblike	določanje oksidirane oblike	določanje celokupnega glutaciona
vzorec (μL)	10	1	1
testni pufer (μL)	80	69	79
reducent (μL)	-	10	10
dušilec (μL)	-	10	-

3.3.10 Ekstrakcija celokupnih proteinov

Po izpostavitvi celic antioksidantom (4 oz. 24 ur) in/ali induktorju oksidativnega stresa (2 uri) smo za vsak vzorec odvzeli dvakrat po 2 mL kulture, centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf), odstranili supernatant ter enega od dveh sedimentov resuspendirali v $250 \mu\text{L}$ PBS (Preglednica 5). Resuspendiran sediment smo združili s pripadajočim neresuspendiranim sedimentom ter mikrocentrifugirko sprali s pufrom PBS, da smo zagotovo prenesli vso biomaso. Po resuspendiranju smo združeno biomaso centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf), odstranili supernatant, pelet (iz 4 mL kulture) pa zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80°C do uporabe.

Zamrznjene vzorce smo odtajali na ledu in jim dodali eno žličko cirkonij-kremenčevih kroglic ter $200 \mu\text{L}$ ekstrakcijskega pufra (Preglednica 13). Sledilo je 2 x 3-minutno razbijanje celic s pomočjo homogenizatorja (Bullet Blender Storm, Next Advance, Inc.) pri hitrosti 8 z vmesnim 5-minutnim intervalom na ledu. Dobljeni homogenat smo centrifugirali 20 minut pri 20000 g in temperaturi 4°C . V ekstraktih smo izmerili koncentracijo proteinov ter jih shranili na -80°C do uporabe.

3.3.11 Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov

Po izpostavitvi celic antioksidantom (4 oz. 24 ur) in/ali induktorju oksidativnega stresa (2 uri) smo za vsak vzorec odvzeli 2 x 20 mL kulture, centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehtnica). Po odstranitvi supernatanta smo sediment resuspendirali v 10 mL pufra PBS (Preglednica 5) ter ponovno centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min. Po spiranju smo supernatant odstranili, sediment pa zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C.

Pred uporabo smo vzorce (za vsak vzorec dva sedimenta) zamrznjene na -80 °C odtajali na ledu in jim dodali v 1250 µL 1x citosolnega ekstrakcijskega pufra (CP), ki je vseboval 2,5 µL 500-kratne raztopine inhibitorja proteaz ter 1,25 µL 1 M raztopine DTT. Resuspendirane vzorce smo prenesli v 12,5 mL TPP centrifugirke z ovalnim dnom ter dodali 5 žličk cirkonij-kremenčevih kroglic. Sledilo je razbijanje celic 5 x 1 minuto na vrtničniku, z vmesnimi 1-minutnimi intervali na ledu. Dobljeni homogenat vzorcev smo centrifugirali 20 minut pri 800 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo prenesli v svežo Eppendorf mikrocentrifugirko ter centrifugirali 10 min pri 800 g in 4 °C, ga ponovno prenesli ter centrifugirali 30 min pri 10000 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo še enkrat prenesli v novo mikrocentrifugirko in ga centrifugirali 20 min pri 20000 g in 4 °C, sediment, ki je predstavljal mitohondrijsko frakcijo pa smo pustili na ledu. Dobljeni supernatant smo shranili kot citosolno frakcijo. Sediment, ki je predstavljal mitohondrijsko frakcijo smo resuspendirali v 1 mL CP, centrifugirali 10 min pri 10000 g in 4 °C in nato postopek spiranja ponovili. Enega od sedimentov smo raztopili v 50 µL mitohondrijskega ekstrakcijskega pufra (MP) z 0,1 µL 500-kratne raztopine inhibitorja proteaz ter 0,05 µL 1 M raztopine DTT in ga prenesli k drugemu pripadajočemu sedimentu.

V tako dobljenih citosolnih in mitohondrijskih frakcijah smo izmerili koncentracijo proteinov ter frakcije shranili na -80 °C do uporabe.

3.3.12 Določanje proteinov

3.3.12.1 Določanje vsebnosti celokupnih proteinov v biomasi

Vsebnost celokupnih proteinov v biomasi smo določili z metodo po Sticklandu (1951). Metoda v osnovi temelji na biuretski reakciji. Dodatek NaOH celicam in naknadno segrevanje omogoči razklop celic z izjemo glukanskih komponent celičnih sten (kvasovke), ki se nato odstranijo s centrifugiranjem skupaj z oborino bakrovega hidroksida, ki nastane po dodatku presežka $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.

Sediment iz 4 mL kulture smo resuspendirali v 2 mL ddH₂O ter 1 mL biomase prenesli v vialo. Resuspendirani biomasi smo dodali 0,5 mL 3 M vodne raztopine NaOH. Vzorce smo 7 minut segrevali v termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf) pri T = 99 °C, ohladili v mrzli vodi in dodali 0,5 mL 2,5 % (w/v) raztopine CuSO₄ x 5H₂O. Po premešanju smo jih 5 min inkubirali na sobni temperaturi, da se je razvila barva. Nato je sledilo centrifugiranje pri 4000 obr./min, 10 min. Supernatant smo v treh ponovitvah nanesti na mikrotitrsko ploščico ter čitalcem mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan) ter programsko opremo Magellan izmerili absorbanco pri valovni dolžini 555 nm. Pri slepem vzorcu smo namesto suspenzije kvasovk uporabili enak volumen ddH₂O. Koncentracijo proteinov smo odčitali iz umeritvene krivulje ter izračunali maso proteinov v uporabljenem volumnu biomase.

Za umeritveno krivuljo smo kot standard uporabili goveji serumski albumin (BSA) s koncentracijo 5 mg/mL (priloga C).

3.3.12.2 Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu

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

Metoda temelji na vezavi barvila Comassie Brilliant Blue G-250 na proteine. Barvilo se primarno veže na bazične in aromatske aminokisline, predvsem arginin. Pri vezavi barvila se rdeča barva spremeni v modro, s tem pa se spremeni absorpcijski maksimum barvila iz 465 na 595 nm. Vezava barvila na proteine je zelo hitra (približno 2 min) in kompleks barvilo-protein je stabilen relativno dolgo (približno 1 uro). K intenziteti barve lahko prispevajo močni alkalni pufri ter prisotnost detergentov: SDS, Triton X-100 ter komercialni detergenti za steklovino.

Metoda se lahko izvaja v dveh izvedbah: standardni proceduri ("standard assay") za koncentracije proteinov od 0,1 do 1 µg/µL ter mikro proceduri ("micro assay") za območje koncentracij od 0,01 do 0,1 µg/µL.

Uporabili smo standardno proceduro. V jamice mikrotitrskih ploščic smo odpipetirali 4 µL ustreznega redčenega ekstrakta in dodali 196 µL 5-krat redčenega Bradford reagenta. Slep vzorec je predstavljal pufer ekstrakta. Po premešanju in 5 minutni inkubaciji smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan) ter programsko opremo Magellan izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

Koncentracijo proteinov v ekstraktih smo določili na podlagi umeritvene krivulje (priloga D). Za pripravo le te smo uporabili BSA v različnih koncentracijah: 0 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L, 0,8 g/L in 1 g/L. V jamice mikrotitrne ploščice smo v treh ponovitvah nanesti 4 μ L raztopine z različno koncentracijo BSA in dodali 196 μ L 1x Bradford reagenta. Po premešanju in 5- minutni inkubaciji smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan) ter programsko opremo Magellan izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm.

3.3.13 Dvodimenzionalna elektroforeza (2-D PAGE)

Z dvodimenzionalno elektroforezo ločujemo proteine v dveh dimenzijah. V prvi dimenziji jih ločimo glede na izoelektrično točko, v drugi pa še glede na molekularno maso.

3.3.13.1 Prva dimenzija (izoelektrično fokusiranje)

Izoelektrično fokusiranje je elektroforetska metoda, ki ločuje proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI). Metoda se uporablja za analizo oziroma ločevanje amfoternih molekul. Proteini so amfoterne molekule, ki nosijo pozitivni, negativni ali nevtralni neto naboj, ki je odvisen od pH okolja. Neto naboj proteinov je vsota vseh pozitivnih in negativnih nabojev stranskih verig aminokislin ter N- in C-terminalnega konca. Izoelektrična točka (pI) je specifična pH vrednost, pri kateri je neto naboj proteina nič. Proteini so pozitivno nabiti pri pH vrednostih pod njihovo pI vrednostjo ter negativno nabiti pri pH vrednostih nad njihovo pI vrednostjo. Ključnega pomena za izoelektrično fokusiranje je prisotnost imobiliziranega pH gradienta, ki je lahko linearen ali nelinearen. Pod vplivom električne napetosti proteini vzdolž pH gradienta potujejo do točke gradienta v kateri je njihov neto naboj nič, torej v skladu s svojo pI. Pozitivno nabiti proteini potujejo proti negativno nabiti elektrodi (katodi), negativno nabiti proteini pa potujejo proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi) (GE Healthcare, 2004).

3.3.13.1.1 Priprava ekstraktov za določanje oksidativnih poškodb proteinov

Za določanje oksidativnih poškodb proteinov v gelu smo modificirali metodo, ki so jo razvili Poon in sod. (2007). Prednost metode je v detekciji oksidativno poškodovanih proteinov (karbonilacije) in celokupnih proteinov na istem gelu.

Ekstrakte, v katerih smo določali oksidativne poškodbe, smo pripravili tako, da smo ustrezen volumen ekstrakta (volumen, v katerem je masa proteinov 100 μ g) zmešali z 10 μ L založne raztopine barvila Alexa Fluor 488 s koncentracijo 2 μ g/ μ L ter dobro premešali. Vzorce smo inkubirali 2 uri na sobni temperaturi nato pa še 2 uri na 37 °C.

3.3.13.1.2 Priprava ekstraktov za nanos na IPG trakove

Volumen ekstrakta v katerem je bila masa proteinov 100 µg smo zmešali z rehidracijskim pufrom (Preglednica 17), tako da je bil končni volumen vzorca in rehidracijskega pufra 250 µL. Pri vzorcih v katerih smo določali oksidativne poškodbe, smo zaradi barvila Alexa Fluor 488 dodali 10 µL rehidracijskega pufra manj. Uporabljali smo rehidracijski pufer s pH 4-7. Vzorce smo dobro premešali, inkubirali na sobni temperaturi 15 minut ter centrifugirali 5 min na 12500 obr./min (centrifuga miniSpin, Eppendorf), da smo odstranili morebitne netopne nečistoče v vzorcih.

Rehidracijski pufer vsebuje ureo, tioureo, neionski detergent (CHAPS), DTT, IPG pufer in sledilno barvilo (BFM). Urea in tiourea sta kaotropna, ki denaturirata proteine ter povečata njihovo topnost. CHAPS je detergent, ki poveča topnost hidrofobnih proteinov ter preprečuje agregacijo proteinov. DTT je reducent, ki prekinja disulfidne vezi ter vzdržuje proteine v popolnoma reducirani obliki (GE Healthcare, 2004).

3.3.13.1.3 Rehidracija IPG trakov

Uporabili smo trakove z imobiliziranim pH gradientom (4-7) dolžine 13 cm, ki smo jih hranili pri $T = -20^{\circ}\text{C}$. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrov. Podstavek smo najprej uravnali v ravnotežno lego nato pa smo na sredino reže odpipetirali 250 µL rehidracijske raztopine z raztopljenimi proteini. Z IPG traku smo z anodnega konca (+) odstranili plastično folijo, ki prekriva gel in ga previdno brez prisotnosti mehurčkov položili z gelom navzdol v režo na vzorec.

Trakove smo prekrili s 3 mL mineralnega olja ter tako preprečili kristalizacijo uree in evaporacijo vode iz rehidracijskega pufra. Podstavek za rehidracijo smo prekrili s pokrovom ter pustili, da so se trakovi rehidrirali čez noč.

3.3.13.1.4 Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo (20°C) med potekom izoelektričnega fokusiranja smo nanесли 4 mL mineralnega olja ter čezenj postavili stekleni podstavek z elektrodnimi priključki. Anodni priključek je bil nameščen na vrhu plošče. V stekleni podstavek smo nalili 10 mL mineralnega olja ter čezenj brez tvorbe mehurčkov položili plastično folijo z vdolbinami. Po rehidraciji smo IPG trakove previdno sprali z ddH₂O ter jih posušili na papirnati brisači z gelom navzgor. S spiranjem smo s trakov odstranili kristale uree ter proteine, večje od 120 kDa, ki med rehidracijo ne vstopijo v gel. Trakove smo nato položili v vdolbine plastične folije z gelom navzgor in pozitivnim koncem na

zgornjem delu plošče (anodna stran). Odrezali smo dva elektrodna trakova, ju omočili v ddH₂O ter popivnali na papirnati brisači. Elektrodna trakova smo položili na anodni (+) in katodni (-) konec IPG trakov. Na sredino elektrodnih trakov smo vpeli elektrodi, trakove prelili s 130 mL mineralnega olja ter pokrili s pokrovom.

Ploščo za izoelektrično fokusiranje smo priključili na usmernik. Izoelektrično fokusiranje poteka v 4 fazah:

1. faza	0-300 V	≤ 2 mA	≤ 5 W	1 min
2. faza	300 V	≤ 2 mA	≤ 5 W	1 h
3. faza	300-3500 V	≤ 2 mA	≤ 5 W	1 h 30 min
4. faza	3500 V	≤ 2 mA	≤ 5 W	5 h

Izoelektrično fokusiranje je potekalo pri 20 °C.

Po končanem IEF smo trakove položili v plastično folijo ter jih do izvedbe druge dimenzije shranili na -80 °C.

3.3.13.2 Druga dimenzija (SDS poliakrilamidna elektroforeza)

SDS-PAGE (SDS poliakrilamidna elektroforeza) je elektroforezna metoda za ločevanje polipeptidov in proteinov glede na njihovo molekulsko maso (M_r). Metoda temelji na uporabi anionskega detergenta (SDS), ki denaturira proteinske molekule, jih razvije in obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule SDS negativen naboj, zamaskirajo naboj proteina, tako da imajo vsi s SDS denaturirani proteini negativen naboj. SDS se veže na proteine v razmerju 1,4 g SDS/g proteina. Ker so proteini denaturirani, je hitrost njihovega potovanja odvisna le od velikosti oziroma molekulske mase. Velikost naboja je odvisna od velikosti proteina. V električnem polju vsi proteini potujejo proti pozitivno nabiti anodi, hitrost njihovega potovanja pa je obratno sorazmerna z njihovo velikostjo. Večje molekule potujejo počasneje od manjših, ker jim gel nudi večji upor. Po določenem času torej manjše molekule prepotujejo daljšo razdaljo od katode do anode kot večje molekule (GE Healthcare, 2004; Sepčič in sod., 2002).

3.3.13.2.1 Vlivanje poliakrilamidnih gelov

Za ločevanje proteinov glede na molekulsko maso smo uporabili poliakrilamidne gele.

Osnovni gradnik poliakrilamidnih gelov je akrilamid. Poliakrilamidni geli nastanejo s polimerizacijo akrilamida v prisotnosti manjših količin prečnega povezovalca bisakrilamida oziroma N,N'-metilen-bisakrilamida, amonijevega persulfata (APS) ter

N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED). Polimerizacija akrilamida steče v prisotnosti prostih radikalov. Vir prostih radikalov so persulfatni ioni ($S_2O_8^{2-}$), ki jih dodamo v obliki amonijevega perulfata. Katalizator polimerizacije je TEMED, ki katalizira razpad persulfatnih ionov v radikale ter jih stabilizira. Persulfatni prosti radikali pretvorijo del akrilamidnih monomerov v proste radikale, ki reagirajo z neaktiviranimi monomeri ter tako sprožijo nastanek linearnih verig. Zaradi prisotnosti bisakrilamida se te linearne verige prečno povežejo in tvorijo gel (Shi in Jackowski, 1998).

Od razmerja med akrilamidom in bisakrilamidom kot tudi od končne koncentracije obeh komponent je odvisna velikost por in rigidnost gela. Velikost por je obratno sorazmerna količini akrilamida. Gele z nizkim odstotkom akrilamida uporabljamo za ločevanje velikih proteinov in obratno. Ker je kisik inhibitor polimerizacije, je potrebno akrilamidno raztopino pred polimerizacijo razpliniti (García-Descalzo in sod., 2012).

Sestavili smo kalup, ki ga tvorita stekleni plošči, ki imata na levi in desni strani distančnik debeline 1 mm. Distančnika zagotavljata primerno razdaljo med ploščama in s tem debelino gela. Plošči z distančnikoma smo vpeli z vijaki v nosilec. Tako sestavljen kalup smo s stiščki vpeli v podstavek. Med plošči smo s pipeto enakomerno vlili 19 mL 12 % ločevalnega gela (Preglednica 24). Čez ločevalni gel smo do višine steklenih plošč vlili ddH₂O, ki preprečuje stik kisika z gelom ter tako omogoči, da gel enakomerno polimerizira ter da je le ta na vrhu raven. Polimerizacija gelov je potekala preko noči. Polimerizacija akrilamida in bisakrilamida namreč poteče v eni uri, medtem ko t.i. tiha polimerizacija, ki je potrebna za popolno formacijo gela, poteka več ur pri sobni temperaturi (Westermeier, 2007). Naslednji dan smo iz kalupa odlili vodo in površino gela dobro osušili.

3.3.13.2.2 Uravnoteženje IPG trakov

Trakove z imobiliziranim pH gradientom smo vzeli iz zamrzovalnika ter jih zaporedoma sprali v 4 epruvetah z 1x SDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 20). Trakove smo osušili na papirnati brisači, jih prenesli v epruvete z 10 mL pufru za uravnoteženje I ter inkubirali na stresalni plošči (Biometra) 15 minut. Iz pufru za uravnoteženje I smo jih prenesli v pufer za uravnoteženje II ter jih ponovno inkubirali na stresalni plošči 15 minut. Trakove smo po končanem uravnoteženju prenesli na papirnat brisačo in jih osušili.

Osnovni pufer za uravnoteženje vsebuje Tris-HCl, SDS, ureo in glicerol. Tris-HCl vzdržuje IPG trakove v pH območju, ki je primeren za elektroforezo. SDS vzdržuje proteine v denaturirani obliki. Urea in glicerol zmanjšujeta efekt elektroendoosmoze, poleg tega glicerol izboljša prenos proteinov iz prve v drugo dimenzijo.

Pufer za uravnoteženje I vsebuje tudi DTT, ki vzdržuje denaturirane in nealkilirane proteine v reduciranem stanju. Pufru za uravnoteženje II je dodan iodacetamid, ki alkilira presežek ditiotreitola in tiolne skupine proteinov ter tako prepreči njihovo reoksidacijo med potekom elektroforeze.

3.3.13.2.3 Prenos IPG trakov na ločevalni gel

Agarozno raztopino (Preglednica 25) smo segreli na 100 °C, da se je utekočinila ter jo vlili nad ločevalni gel. Skozi tekočo agarozo smo spustili IPG trak, ga nežno potisnili do ločevalnega gela in počakali, da se je agaroz strdila.

3.3.13.2.4 SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

Z robov steklenih plošč smo odstranili odvečno agarozo ter kalup s stiščki vpeli v zgornjo posodo za SDS-PAGE. Podstavek smo odstranili, kalup z zgornjo posodo pa prenesli v spodnjo posodo za SDS-PAGE, napolnjeno z 1x SDS elektroforeznim pufrom. V zgornjo posodo pa smo nalili sveže pripravljen 1x SDS elektroforezni pufer (Preglednica 20).

Spodnjo posodo smo pokrili s pokrovom ter jo povezali z usmernikom. SDS-PAGE poteka v dveh fazah. Prva faza traja 15 min pri električnem toku 20 mA/gel. V drugi fazi je električen tok 40 mA/gel in poteka dokler bromfenol modro ne doseže spodnjega roba gela. Druga faza je običajno potekala približno 1 uro in 40 minut.

SDS-PAGE je potekala pri 15 °C. Po končani elektroforezi smo kalupe razdrli, odstranili IPG trakove ter gele na zgornjih robovih ustrezno označili.

3.3.13.3 Detekcija oksidativno poškodovanih proteinov

Za detekcijo oksidativno poškodovanih proteinov v gelu smo uporabili barvilo Alexa Fluor[®] 488 hydroxylamine (Invitrogen).

Alexa Fluor 488 je komercialno dostopen zeleno fluorescentni hidroksilamin, ki z aldehidi in ketoni tvori oksime (Life Technologies Corporation, 2012a). Je dobra alternativa barviloma Cy2 in fluoresceinu (FITC) (Life Technologies Corporation, 2012b).

Alexa Fluor[®] 488 hydroxylamine ima nekatere pomembne prednosti pred alternativnimi barvili:

- svetlost: barvilo oddaja močnejšo fluorescenco kot podobna barvila;
- fotostabilnost: zaradi fotostabilne fluorescence je čas zajetja slike lahko daljši;
- neobčutljivost: fluorescenca je neobčutljiva v pH v območju med 4 in 10;
- topnost v vodi (Life Technologies Corporation, 2012c).

Barvilo so uspešno vpeljali v metodo detekcije karboniliranih proteinov v 2-D poliakrilamidnih gelih (Chaudhuri in sod., 2006; Poon in sod., 2007). Za kvantitativno določanje vsebnosti karbonilov v raztopini proteinov barvilo ni primerno, ker je odstranitev nevezanega barvila s TCA precipitacijo ali gelsko filtracijo težavna. Nevezano barvilo v postopku 2-D PAGE ne predstavlja težav, saj se med potekom elektroforeze loči od proteinov (Chaudhuri in sod., 2006).

Po končani elektroforezi in razdrtju kalupov smo gele 5 minut spirali v ddH₂O na stresalni plošči (Biometra), da smo sprali odvečen SDS.

3.3.13.4 Barvanje gelov

Za detekcijo celokupnih proteinov smo gele barvali z barvilom Sypro Ruby (Preglednica 32). Barvilo ima optimalno vzbujevalno svetlobo pri dveh valovnih dolžinah, in sicer 302 in 470 nm, maksimum oddane svetlobe pa je pri valovni dolžini 610 nm.

Barvilo Sypro Ruby vsebuje organsko komponento in komponento težke kovine-rutenija. Je občutljivo in vsestransko barvilo za barvanje proteinov v 1-D ali 2-D SDS poliakrilamidnih gelih. Barvilo je kompatibilno s post elektroforetskimi metodami za identifikacijo proteinov kot sta sekveniranje po Edmanu in masna spektrometrija (Berggren in sod., 2000; Lopez in sod., 2000; Berggren in sod., 1999).

Meja detekcije za barvilo je 1-2 ng proteina na 2-D elektroforetsko liso. Občutljivost barvila je podobna barvanju s srebrom, vendar mnogo večja kot pri barvanju z barvilom Coomassie[®] Brilliant Blue. Prekomerno obarvanje gelov z barvilom ni možno. Ker je intenziteta fluorescence linearno odvisna od količine proteina, barvilo omogoča kvantitativno ovrednotenje proteina. Linearni razpon za kvantifikacijo je za približno tri razrede večji kot pri barvanju s srebrom ali barvilom Coomassie blue (Berggren in sod., 2000; Lopez in sod., 2000; Görg in sod., 2000).

Barvilo omogoča detekcijo glikoproteinov, proteinov, ki vežejo kalcij, lipoproteinov, fibrilarnih proteinov in ostalih proteinov, katerih barvanje je običajno oteženo. Barvilo nukleinskih kislin ne detektira (Berggren in sod., 2000). Vezava barvila Sypro Ruby na

proteine je nekovalentna. Pri kislem pH se veže na primarne amine proteinov. Najmočnejše interakcije tvori z lizinom, argininom in histidinom, šibkejše pa z tirozinom in triptofanom (Steinberg in sod., 2000).

Pred barvanjem smo gele fiksirali in s tem preprečili difuzijo proteinov v in iz gela ter sprali odvečen SDS. Po barvanju smo gele razbarvali, da smo odstranili nevezano barvilo iz gelov.

Preglednica 32: Postopek barvanja gelov.

Table 32: Gel staining procedure.

korak	raztopina	čas
fiksacija	fiksacijska raztopina	2 x 30 min
barvanje	barvilo Sypro Ruby	preko noči
razbarvanje	raztopina za razbarvanje	2 x 30 min
spiranje	ddH ₂ O	3 x 5 min

Za en gel smo uporabili 150 mL raztopine oziroma barvila. Za barvanje dveh gelov v posodi pa smo uporabili 250 mL raztopine oziroma barvila.

Po fiksaciji gelov je nadaljnji postopek barvanja potekal v temi, ker je fluorescentno barvilo Sypro Ruby občutljivo na svetlobo. Plastične posode, v katerih smo stresali gele na stresalni plošči pa smo zato zaščitili tudi z alu folijo. Pri razbarvanju gelov smo gel prenesli v novo posodo ter tako preprečili spiranje barvila vezanega na stene posode in s tem povečali učinkovitost spiranja gelov.

3.3.13.5 Slikanje gelov

Gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR-Gbox kamero (Syngene).

3.3.13.5.1 Alexa Fluor® 488 hydroxylamine

Fluorescentno barvilo Alexa Fluor® 488 hydroxylamine ima ekscitacijsko svetlobo valovne dolžine 495 nm in emisijsko svetlobo valovne dolžine 519 nm.

Za detekcijo barvila smo kot izvor ekscitacijske svetlobe izbrali osvetlitev Cy2 ter filter 525 za detekcijo oddane svetlobe. Stalni parametri pri slikanju so bili zaslonka 1,2; povečava 12,5; fokus 140; čas izpostavitve za zajetje slike 1 s ter čas izpostavitve za slikanje 2 min 30 s.

3.3.13.5.2 Sypro Ruby

Barvilo Sypro Ruby ima ekscitacijsko svetlobo valovne dolžine 280 nm in emisijsko svetlobo valovne dolžine 610 nm. Za detekcijo barvila smo kot izvor ekscitacijske svetlobe izbrali UV transiluminator. Stalni parametri pri slikanju so bili zaslonka 1,2; povečava 12,5; fokus 140 in čas izpostavitve 80 ms.

3.3.13.6 Analiza slik

Slike gelov smo analizirali z računalniškim programom 2-D Dymension (Syngene). Program nam omogoča primerjavo več slik gelov. Pred začetkom obdelave smo določili referenčni gel, s katerim smo primerjali vse ostale gele. Pred primerjavo slik gelov smo na vseh slikah določili območje, ki smo ga želeli primerjati z ostalimi slikami gelov ter na ta način iz analize odstranili moteče lise na slikah gelov. Za posamezni vzorec smo analizirali 3 gele, ki so predstavljali biološke ponovitve.

Program skupne 2-D lise na gelih poveže in jih primerja med seboj. 2-D elektroforetske lise kvantitativno ovrednoti na podlagi oblike in intenzitete. Vse 2-D lise, ki jih je program označil, smo pregledali in preverili, ali so ustrezno obkrožene in ali se vsaka posamezna 2-D lisa kontrolnega gela ujema z lisami na ostalih gelih. Program rezultate analize izpiše v obliki tabele, v kateri je izračunano razmerje normaliziranih volumnov za vse 2-D lise, ki so prisotne na vseh primerjanih gelih. Normalizirani volumen predstavlja razmerje med volumnom ene lise in celokupnim volumnom vseh lis na gelu.

Proteine smo upoštevali kot diferencialno izražene, če je bilo razmerje med normaliziranimi volumni glede na referenčni gel večje od 2,0 ter statistično značilno ($p < 0,05$). Statistična značilnost diferencialnega izražanja je bila preverjena s testom ANOVA.

3.3.13.7 Identifikacija proteinov

Za določitev identitete proteinov smo proteine poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo (MS) na Škotsko (University of Aberdeen, Aberdeen).

3.3.14 Statistična analiza rezultatov

Rezultati testov, ki so bili narejeni na celični in molekularni ravni kulture, tretirane z antioksidantoma in/ali induktorjem stresa, so bili statistično obdelani s t-testom oziroma s testom Duncan.

Statistično značilne razlike med tretiranimi vzorci in kontrolo smo ugotavljali s t-testom.

Statistično značilne razlike med različnimi tretiranjmi smo ugotavljali z Duncanovim testom mnogoterih primerjav s 95 % intervalom zaupanja.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* V STACIONARNI FAZI RASTI KOT MODELNI ORGANIZEM

Kvasovka je eden najenostavnejših evkariontskih modelov, ki ima osnovne celične procese enake kot humane celice (Müller in Grossniklaus, 2010). Kot modelni organizem ima veliko prednosti. Gojimo jo lahko kot suspenzijo v tekočem mediju ali v obliki kolonij na trdnem gojišču, aerobno in anaerobno. Za rast potrebuje definirano, enostavno in poceni gojišče (Simon in Bedalov, 2004). S prilagajanjem okoljskih parametrov lahko učinkovito in uspešno kontroliramo njeno rast in razmnoževanje. Ima kratek podvojevalni čas, ki traja le 90 minut. Zaradi naštetih lastnosti je njeno vzdrževanje enostavno in poceni (Menacho-Márquez in Marguía, 2007). Po inokulaciji celic v gojišče bogato z glukozo, se le te razmnožujejo, dokler ne zmanjka vira ogljika. Tako kultura doseže nasičenost ter vstopi v stacionarno fazo rasti (Gray in sod., 2004; Fuge in sod., 1994).

Termin stacionarna faza se je do nedavnega uporabljal tako za opis nasičenosti kulture kot tudi stanja celic v tej kulturi. Nato pa so Gray in sod. (2004) predlagali spremembo v uporabi termina. Predlagali so, da se termin stacionarna faza uporablja za opis stanja nasičene kulture, medtem ko se za opis stanja celic v tej kulturi uporablja termin mirovanje. Zaradi slabšega poznavanja faze mirovanja, se je povečal tudi interes za uporabo kvasovke kot modelnega organizma, ker omogoča razumevanje sprememb v metabolizmu in fiziologiji, ki celicam omogočajo preživetje v stacionarni fazi rasti. V nedeleče se stanje oz. fazo mirovanja (G_0 fazo) celice vstopijo, ko okoliščine niso primerne za razmnoževanje.

V mnogih študijah, v katerih so preučevali vpliv različnih okoljskih onesnaževalcev, toksičnih kemikalij, težkih kovin in elektromagnetnega sevanja, so kot modelni organizem uporabili *S. cerevisiae* ter izsledke svojih študij ekstrapolirali na humane celice (Santos in sod., 2009; Howlet in Avery, 1997; Gos in sod., 1997). V vseh študijah so uporabili eksponentno rastoče celice, ki niso podobne humanim celicam. Tako humane kot ostale evkariontske celice večino časa preživijo v fazi mirovanja (Lewis in Gattie, 1991), ki je podobna stacionarni fazi rasti kvasovk (Martinez in sod., 2004; Gray in sod., 2004).

Mirujoče kvasne in mirujoče sesalske celice so si v mnogih pomembnih lastnostih podobne. Oba tipa celic imata v fazi mirovanja značilno urejene kromosome (Pinon, 1978), povečano stopnjo avtofagije, zmanjšano hitrost translacije (Fuge in sod., 1994; Dickson in Brown, 1998) ter genom, ki se ne podvaja (Pringle in Hartwell, 1981). Za večino celic humanih tkiv in organov, kot na primer za nevrone in celice skeletnih mišic, je nedeleče, mirujoče stanje običajna oblika življenja. Kvasovka *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti je

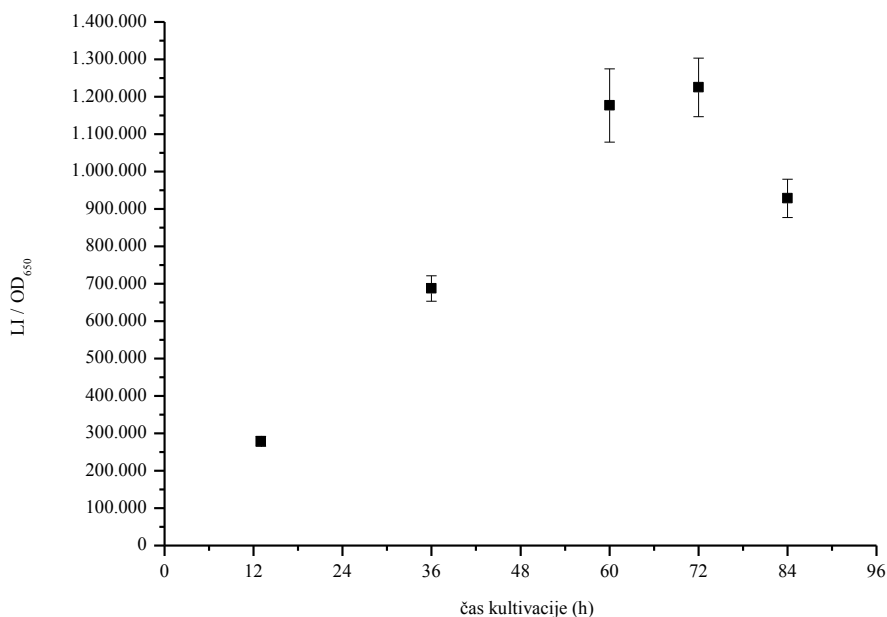
primeren model za študij poškodb, ki nastanejo zaradi oksidativnega stresa in staranja tudi zato, ker ima s celicami višjih organizmov skupne mnoge lastnosti: respiratorni metabolizem je glavni vir energije, poškodbe se tekom časa kopičijo v celicah, imajo enake obrambne mehanizme (Longo in sod., 1996; Moradas-Ferreira in sod., 1996; Gralla in Kosman, 1992).

Kvasovke v stacionarni fazi rasti imajo obrambne mehanizme, ki odstranjujejo in popravljajo poškodbe (Gray in sod., 2004) ter so sposobne dolgo časa preživeti v vodi ali minimalnem mediju brez hranil (Lillie in Pringle, 1980).

Ker smo želeli uporabiti kvasovko *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti kot modelni organizem, smo jo okarakterizirali na celični ravni ter na ravni proteoma. Na celični ravni smo spremljali optično gostoto, živost in kultivabilnost, znotrajcelično oksidacijo in celično energijsko metabolno aktivnost, medtem ko smo na ravni proteoma z 2-D PAGE izvedli analizo proteinskega profila celičnega ekstrakta.

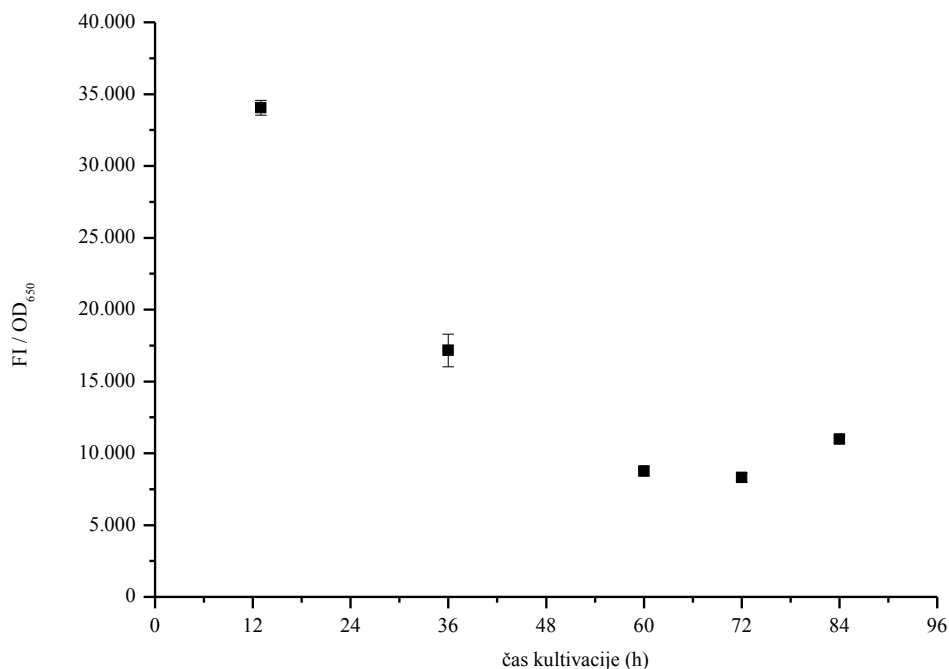
4.1.1 Okarakterizacija kvasovke v stacionarni fazi rasti na celični ravni

Kvasovke smo kultivirali v YEPD gojišču do nasičenja oziroma stacionarne faze rasti, ki smo jo določili z merjenjem optične gostote pri 650 nm (OD_{650}), živosti, celične energijske metabolne aktivnosti in znotrajcelične oksidacije. Po 60 urah kultivacije je kultura prešla postdiauksično fazo rasti in dosegla nasičenost, kar smo potrdili z merjenjem živosti celic, ki se po 60-ih urah kultivacije skoraj ni več spreminjala. V času 60 ur po začetku kultivacije sta se tako celični energijski metabolizem kot tudi znotrajcelična oksidacija ustalila (Slike 7, 8, 9).



Slika 7: Celična energijska metabolična aktivnost kvasovke *S. cerevisiae* tekom kultivacije v gojišču YEPD. Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj treh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot normalizirana luminiscenčna intenziteta (LI/OD₆₅₀).

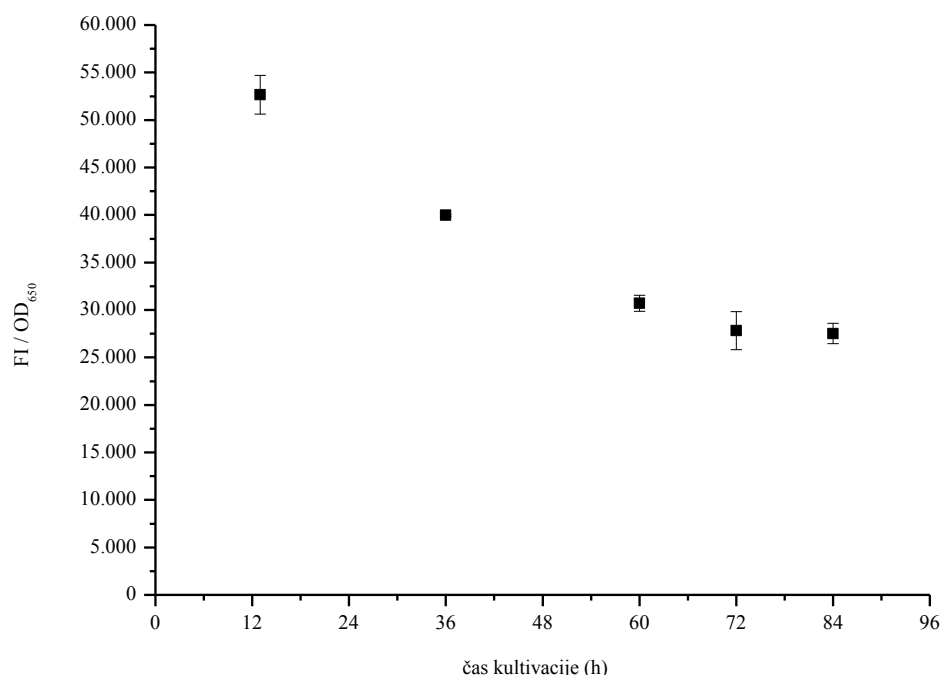
Figure 7: Cell energy metabolic activity in the yeast *S. cerevisiae* grown in YEPD medium. Data are means ($\pm$ se) of at least three independent experiments, and are expressed as LI/OD₆₅₀.



Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *S. cerevisiae* tekom kultivacije v gojišču YEPD.

Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj treh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD₆₅₀).

Figure 8: Intracellular oxidation in the yeast *S. cerevisiae* grown in YEPD medium. Data are means ($\pm$ se) of at least three independent experiments, and are expressed as FI/OD₆₅₀.

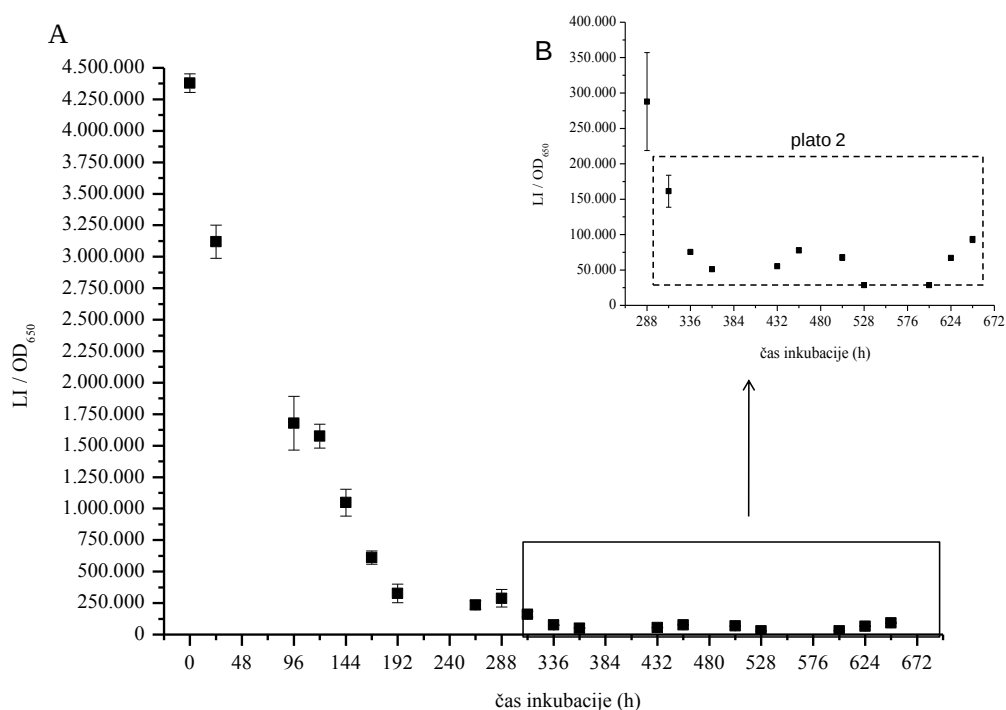


Slika 9: Živost celic kvasovke *S. cerevisiae* tekom kultivacije v gojišču YEPD.

Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj treh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD₆₅₀).

Figure 9: Cell viability in the yeast *S. cerevisiae* grown in YEPD medium. Data are means ($\pm$ se) of at least three independent experiments, and are expressed as FI/OD₆₅₀.

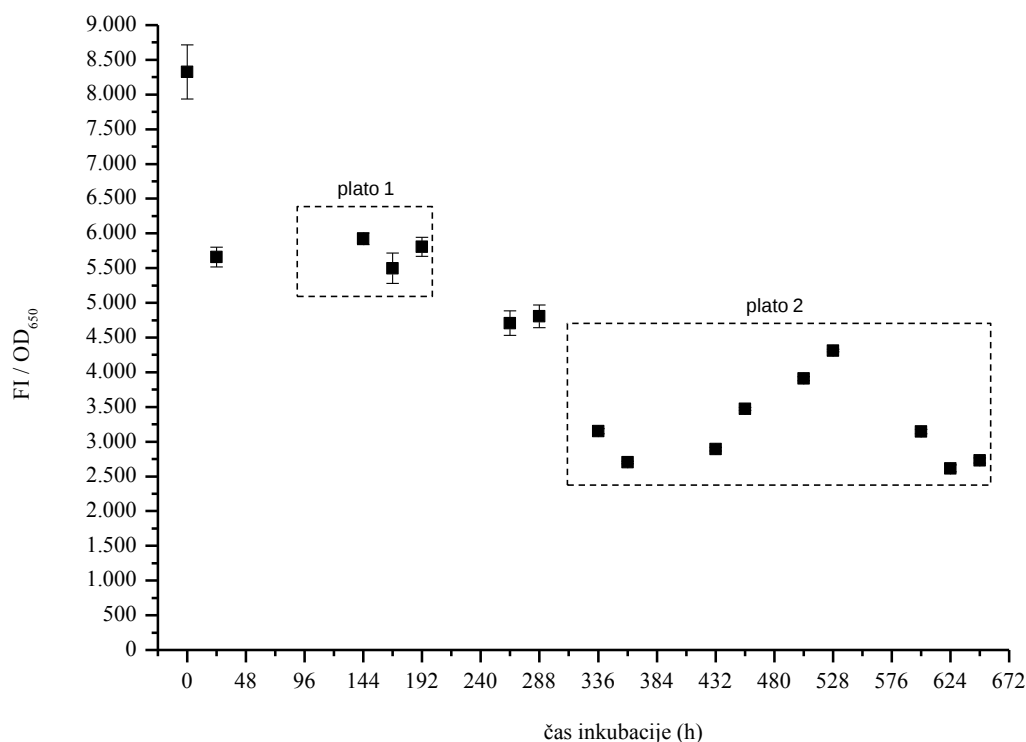
Kulturo smo prenesli v pufer PBS ter z merjenjem optične gostote, živosti celic, celične energijske metabolne aktivnosti in znotrajcelične oksidacije preučili fiziologijo celic tekom 648-urne inkubacije (220 obr./min, 28 °C). S prenosom kulture iz gojišča YEPD v pufer PBS smo najverjetneje povzročili stres, zato se je celična energijska metabolna aktivnost zvišala in živost znižala (Slike 10, 11, 12). V času od 96 do 192 ur sta živost celic oz. kultivabilnost in znotrajcelična oksidacija skoraj konstantni (Slike 11, 12, 13, plato 1), medtem ko se celična energijska metabolna aktivnost ves čas znižuje (Slika 9). Celice namreč v ne najbolj ugodnih pogojih rasti težijo k znižanju metabolne aktivnosti (Santos in sod., 2009). Vendar kljub nizki količini razpoložljivega ATP celice očitno uspešno vzdržujejo redoks homeostazo. V nadaljevanju inkubacije je opazna prehodna faza (192-312 h), v kateri znotrajcelična oksidacija naraste (slika 13) in se živost oz. kultivabilnost znižata (Sliki 11 in 12). V času prehodne faze se celična energijska metabolna aktivnost preneha zniževati (Slika 10), kar najverjetneje nakazuje na potrebo po energiji zaradi odziva na oksidativni stres.



Slika 10: Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke *S. cerevisiae* med inkubacijo v pufru PBS. (A) čez celotno inkubacijo, (B) plato 2, ki kaže nihanja v času od 312 h do 648 h. Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj treh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot normalizirana luminiscenčna intenziteta (LI/OD₆₅₀).

Figure 10: Cell energy metabolic activity in the yeast *S. cerevisiae* incubated in PBS buffer. (A) Full incubation time course. (B) detail from (A), as indicated, showing oscillations from 312 h to 648 h. Data are means ($\pm$ se) of at least three independent experiments, and are expressed as LI/OD₆₅₀.

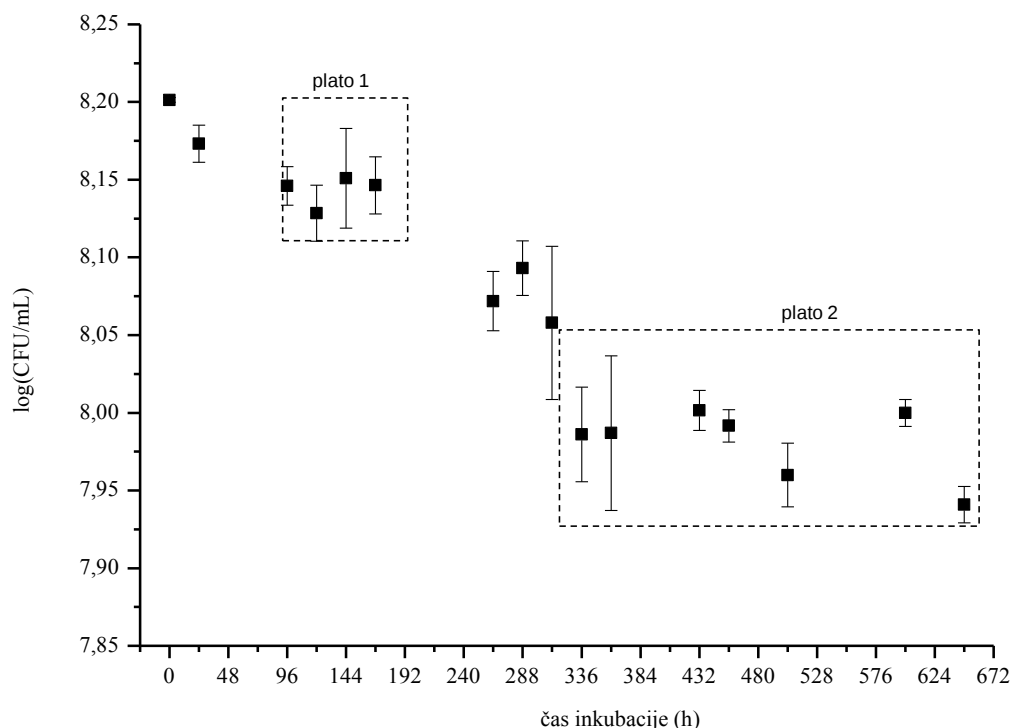
Po prehodni fazi celice preidejo v novo fiziološko stanje, ki traja od 312 ur do 648 ur in smo ga poimenovali plato 2 (Slike 10, 11, 12, 13). Za plato 2 je značilno nihanje vrednosti vseh treh parametrov (celične energijske metabolne aktivnosti, znotrajcelične oksidacije in živosti oz. kultivabilnosti) (Slike 10, 11, 12, 13). Fiziološko stanje kulture v tej fazi je manj stabilno v primerjavi s platojem 1. S slike 13 je razvidno, da je znotrajcelična oksidacija višja kot pri platoju 1. Nihanja v vrednostih znotrajcelične oksidacije in celične energijske metabolne aktivnosti so najverjetneje posledica težnje celic k neprestanemu vzdrževanju redoks homeostaze bodisi z odstranjevanjem ROS in/ali popraviom oziroma odstranjevanjem oksidativnih poškodb.



Slika 11: Živost celic merjena preko integritete celične membrane kvasovk *S. cerevisiae* tekom inkubacije v pufru PBS s prikazanima platojema 1 in 2. Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj dveh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD₆₅₀).

Table 11: Cell viability measured as cell membrane integrity in the yeast *S. cerevisiae* incubated in PBS buffer. Plateau 1 as well as plateau 2 is indicated. Data are means ($\pm$ se) of at least two independent experiments, and are expressed as FI/OD₆₅₀.

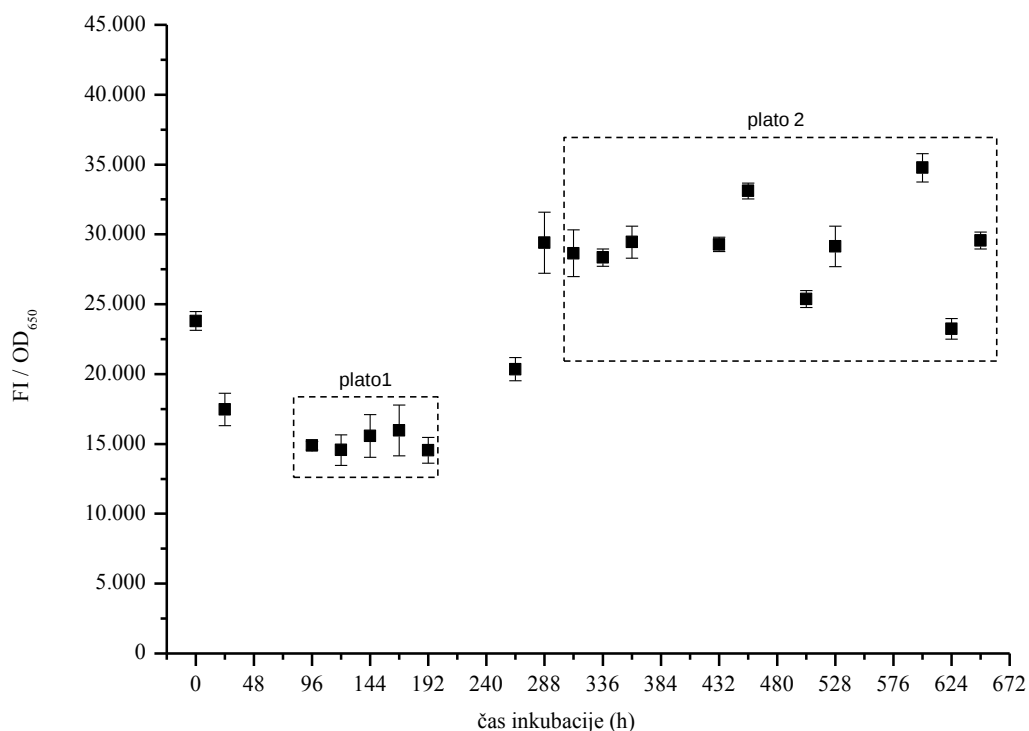
V splošnem velja prepričanje, da za vzdrževanje metabolizma v pogojih stradanja kvasovke uporabljajo glikogen, ki je tudi vir ATP za odzive na oksidativni stres (Lillie in Pringle, 1980; Walker, 1998). Allen in sod. (2006) so dokazali, da imajo celice v G₀ fazi veliko glikogena. Glikogen se v celicah začne kopičiti preden v gojišču zmanjka glukoze ter doseže najvišjo koncentracijo v fazi diauksičnega premika, ko v gojišču zmanjka glukoze. Poleg glikogena celice kopičijo tudi trehalozo, ki celice ščiti pred stresom (Mahmud in sod., 2010; da Costa Morato Nery in sod., 2008). Poleg glikogena in trehaloze naj bi bil za celice v G₀ fazi pomemben tudi metabolizem lipidov. Zaradi mutacije v genu *opi3*, ki kodira encim, ki katalizira zadnjo reakcijo metilacije v biosintezi fosfatidilholina, kvasovke *S. cerevisiae* ne preživijo kultivacije do stacionarne faze rasti (McGraw in Henry, 1989). Znano je tudi, da se pri vstopu celic v fazo mirovanja poveča sinteza triacilglicerolov (Hosaka in Yamashita, 1984), čeprav se nivo biosinteze fosfolipidov zmanjša (Homann in sod., 1987). Vsa ta dejstva kažejo na to, da bi lahko triacilgliceroli celicam v mirujoči fazi služili kot energijska rezerva. Poudariti pa moramo, da pravzaprav še vedno ni popolnoma jasno, kaj je glavni vir energije, ki celicam omogoča, da preživijo daljša obdobja v okolju brez hranil.



Slika 12: Kultivabilnost celic merjena preko CFU kvasovke *S. cerevisiae* tekom inkubacije v pufru PBS s prikazanimi platojema 1 in 2. Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj dveh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot log (CFU/mL).

Figure 12: Cell viability measured as CFU in the yeast *S. cerevisiae* incubated in PBS buffer. Plateau 1 as well as plateau 2 is indicated. Data are means ($\pm$ se) of at least two independent experiments, and are expressed as log (CFU/mL).

V okviru doktorske naloge smo živost merili preko enot, ki tvorijo kolonije (CFU) ter preko integritete celične membrane (Haugland, 2002). Naši rezultati kažejo, da se kultivabilnost znižuje podobno kot živost merjena preko integritete membrane (Sliki 11 in 12). Z merjenjem integritete membrane zaznamo spremembe v membrani, ki nastanejo zaradi peroksidacije lipidov, ki jo povzročajo ROS. Pri platoju 2 (Slika 13) so zaradi višje znotrajcelične oksidacije poleg nihanj v nivoju znotrajcelične oksidacije in celične energijske metabolne aktivnosti opazna tudi nihanja v živosti oz. kultivabilnosti (Sliki 11 in 12). Kljub dolgi inkubaciji v PBS sta živost in kultivabilnost relativno visoki. V času enomesečne inkubacije se živost oz. kultivabilnost zniža za približno dvakrat.



Slika 13: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *S. cerevisiae* tekom inkubacije v pufru PBS s prikazanima platojema 1 in 2. Podatki so povprečje ($\pm$ se) vsaj treh neodvisnih eksperimentov in so izraženi kot normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD₆₅₀).

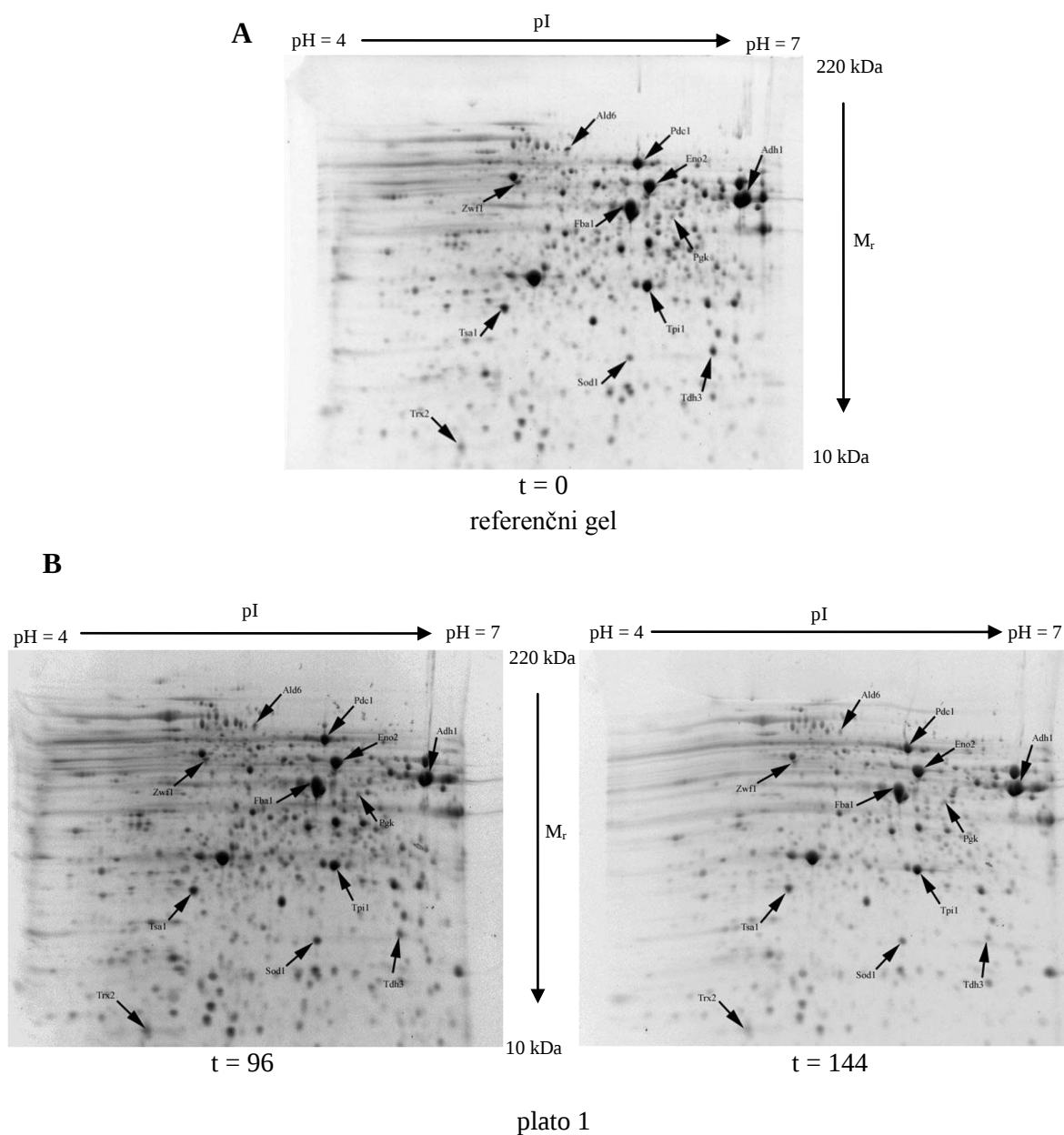
Figure 13: Intracellular oxidation in the yeast *S. cerevisiae* incubated in PBS buffer. Plateau 1 as well as plateau 2 is indicated. Data are means ($\pm$ se) of at least three independent experiments, and are expressed as FI/OD₆₅₀.

4.1.2 Okarakterizacija kvasovke v stacionarni fazi rasti na ravni proteoma

Da bi podrobneje razumeli dogajanje v celicah tekom podaljšane inkubacije v PBS smo ekstrakte celokupnih celičnih proteinov analizirali z 2-D elektroforezo. Proteinske lise smo kvantificirali s pomočjo 2-D Dymension računalniškega programa. Za referenčni gel smo uporabili gel $t = 0$, to je gel s celokupnimi proteini kulture takoj po prenosu iz gojišča YEPD v pufer PBS. Kot diferencialno izražene proteine smo upoštevali tiste, katerih razmerje med normaliziranimi volumni glede na referenčni gel je bilo večje od 2,0 ter statistično značilno (Studentov t-test, $p < 0,05$).

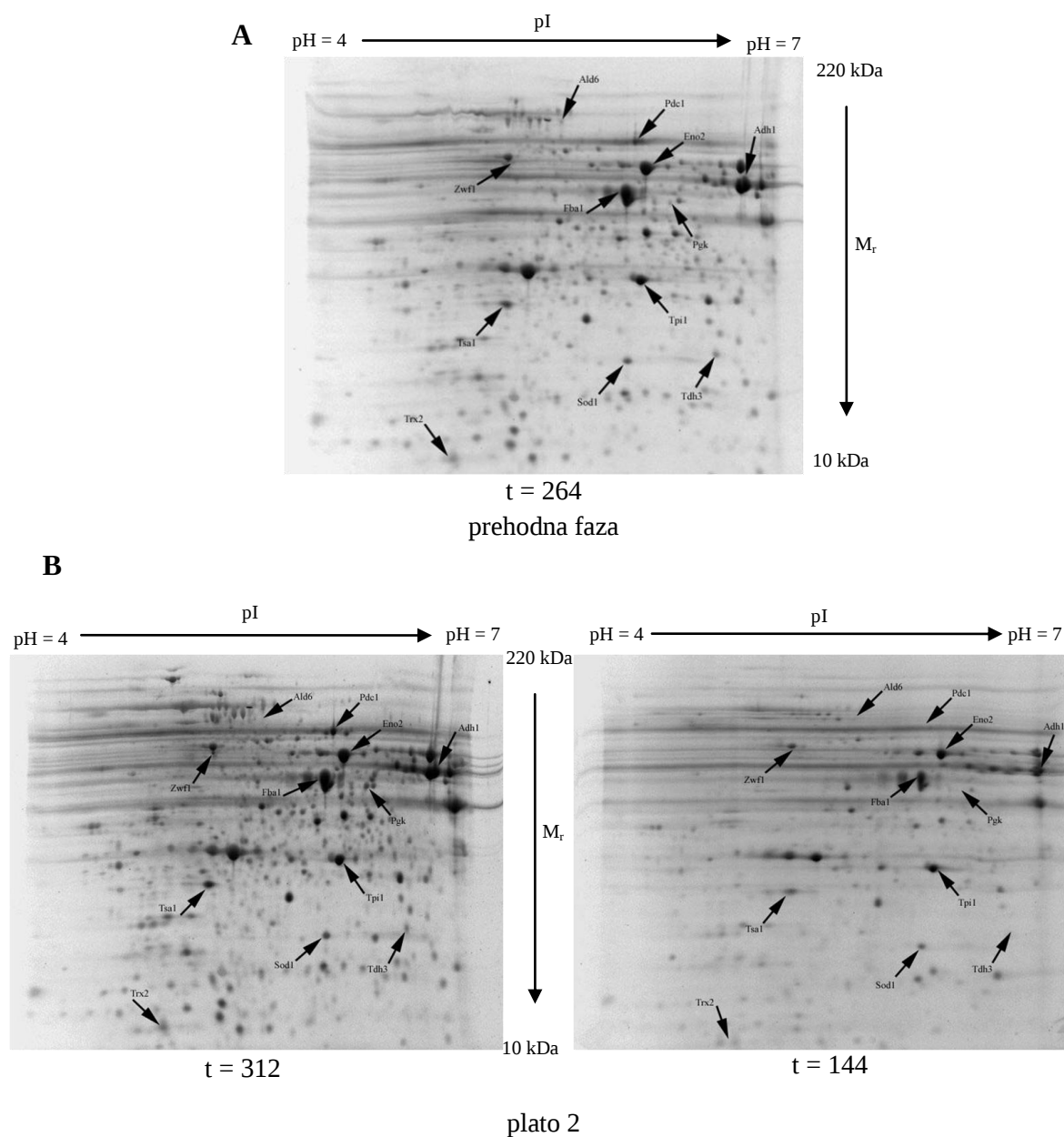
Glede na to, da smo na celični ravni kvasovko okarakterizirali s spremljanjem znotrajcelične oksidacije in celične energijske metabolne aktivnosti, smo se pri analizi proteoma osredotočili na proteine glikolize (fruktoza-1,6-bifosfat aldolaza, Fba1; enolaza, Eno2; gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, Tdh3; 3-fosfoglicerat kinaza, Pgk; triozafosfat izomeraza, Tpi1), alkoholne fermentacije (piruvat dekarboksilaza, Pdc1), metabolizma oz. degradacije etanola (alkohol dehidrogenaza, Adh1; aldehid dehidrogenaza, Ald6), pentoza fosfatne poti (glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, Zwf1) ter nekaterih antioksidativnih proteinov (tiorredoksin peroksidaza, Tsa1; tiorredoksin 2; Trx2; superoksid dismutaza, Sod). Izmed obeh encimov superoksid dismutaze smo detektirali le Sod1 (Priloga E). Celične ekstrakte smo namreč pripravili s homogenizacijo celic s cirkonij-kremenčevimi kroglicami. Pri uporabi te metode ostanejo mitohondriji nepoškodovani, zato v celičnem ekstraktu mitohondrijska superoksid dismutaza (Sod2) ni prisotna.

Raven izbranih proteinov nas je zanimala ob različnih časih inkubacije, in sicer ob časih 96 h in 144 h (plato 1), ob času 264 h (prehodna faza) ter ob časih 312 h in 504 h (plato 2) (Slike 14, 15, 16, 17). Prva sprememba v ravni sinteze proteinov (glede na $t = 0$), ki sodelujejo v energijskih in metabolnih poteh je opazna v prehodni fazi rasti, ko se raven sinteze Ald6 in Tdh3 zniža. To znižanje je še bolj očitno tekom nadaljnje inkubacije (Slika 16). Kot je razvidno s slike 16 so največje spremembe v ravni sinteze proteinov pri 504-urah inkubacije (plato 2), ko nekaterih proteinov (Ald6, Tdh3, Pdc1, Pgk) nismo več detektirali. Znižanje ravni sinteze Tdh3 tekom stacionarne faze rasti lahko pojasnimo z dejstvom, da v eksponentno rastočih celicah lahko detektiramo Tdh2 in Tdh3, medtem ko v celicah v stacionarni fazi rasti primarno detektiramo Tdh1 (Delgado in sod., 2001). Čeprav alkoholna fermentacija v času zasičenja kulture v YEPD gojišču ni vir energije, se nivo sinteze nekaterih encimov, ki so vključeni v proces fermentacije ter postdiauksično fazo rasti, začne zniževati relativno pozno (Ald6 pri 264h in Pdc1 pri 312h). To najverjetneje ni posledica sinteze, temveč njihove stabilnosti. Zato je tudi nivo sintetiziranega Adh1 skozi celotno inkubacijo nespremenjen. Raven proteinov glikolize in pentoza fosfatne poti (Fba1, Eno2, Tpi1 in Zwf1) je prav tako nespremenjena, in sicer verjetno zaradi njihove vzdrževalne ("housekeeping") vloge.



Slika 14: Reprezentativni 2-D proteinski profili ekstraktov kvasovk ob določenih časih inkubacije kvasovke *S. cerevisiae* v pufru PBS. (A) Ob začetku inkubacije v pufru PBS; (B) Po 96 h in 144 h inkubacije v pufru PBS (plato 1). Puščice označujejo imena identificiranih proteinov.

Figure 14: Representative 2-D protein profiles of yeast cell extracts at defined times during incubation of the yeast *S. cerevisiae* in PBS buffer. **A**, Start of incubations in PBS; 0 h. **B**, After 96 h and 144 h, as indicated (plateau 1). Arrows indicate named protein spots of interest.

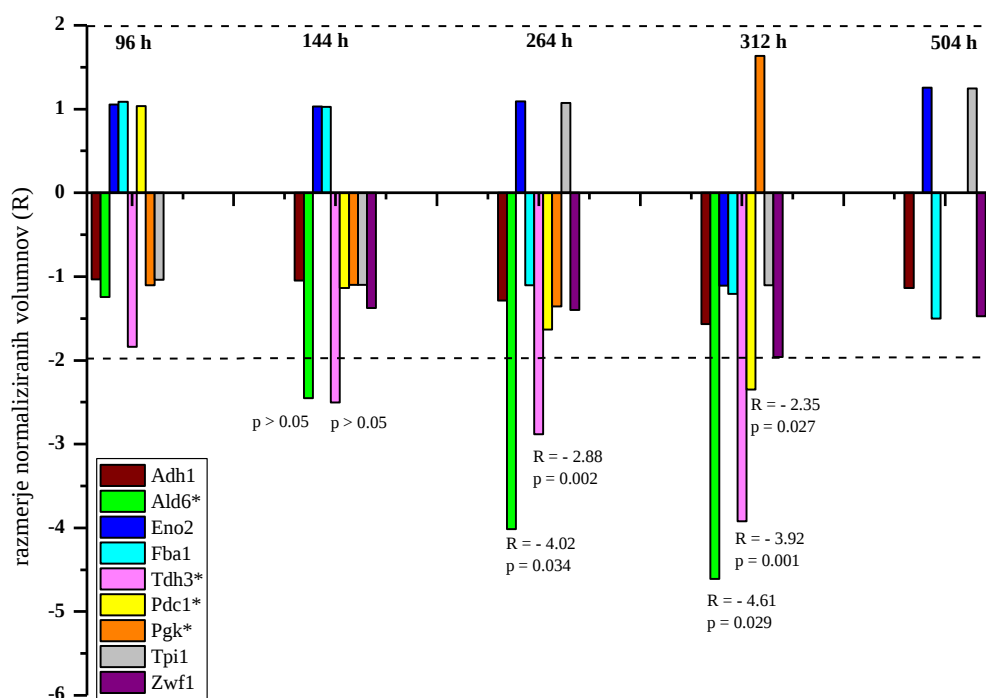


Slika 15: Reprezentativni 2-D proteinski profili ekstraktov kvasovk ob določenih časih inkubacije kvasovke *S. cerevisiae* v pufru PBS. (A) Prehodna faza po 264 h inkubacije v pufru PBS; (B) Po 312 h in 504 h inkubacije v pufru PBS (plato 2). Puščice označujejo imena identificiranih proteinov.

Figure 15: Representative 2-D protein profiles of yeast cell extracts at defined times during incubation of the yeast *S. cerevisiae* in PBS buffer. (A) Transition phase, after 264 h. (B) After 312 h and 504 h, as indicated (plateau 2). Arrows indicate named protein spots of interest.

Tudi v primeru antioksidativnih proteinov (Sod1, Trx2 in Tsa1) sprememb v nivoju sinteze (v primerjavi s $t = 0$) nismo zaznali. Nivo sinteze se ni spremenil pri nobenem času inkubacije, niti pri platuju 1 in 2 (Slika 17). Sod1 ima glavno vlogo pri zaščiti celic pred oksidativnim stresom, medtem ko je Trx2 vpleten v mnoge celične procese, med katerimi je tudi redoks regulacija. Trx2 je donor elektronov mnogim encimom, med katerimi je tudi Tsa1 (Herrero in sod., 2008).

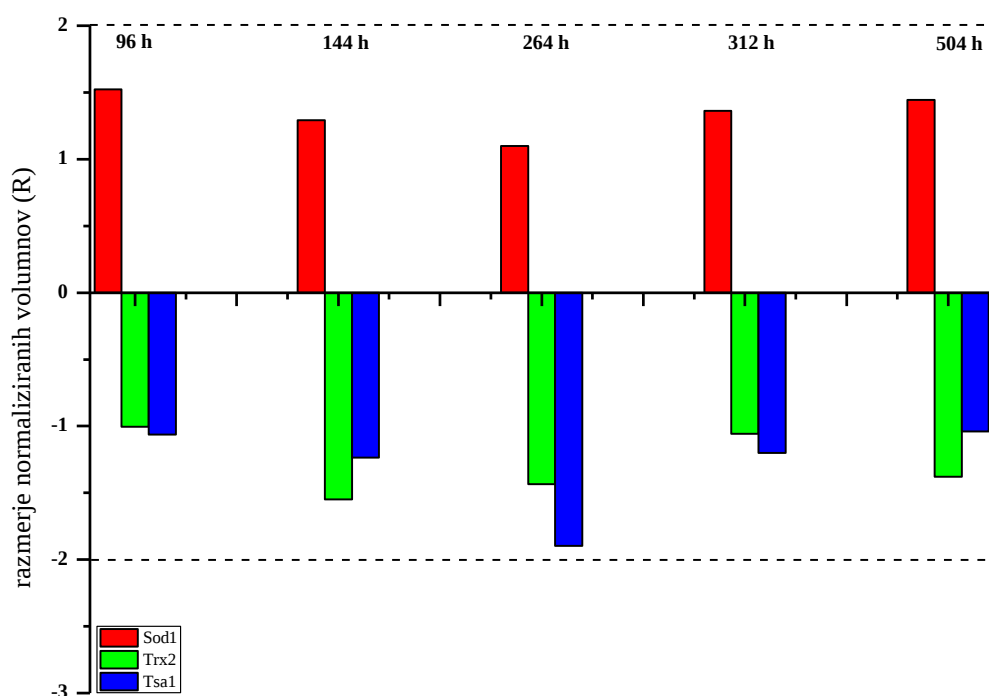
Kljub nihanju nivoja znotrajcelične oksidacije (Slika 13) in ATP (Slika 10) ter nihanja živosti oz. kultivabilnosti kulture (Sliki 11 in 12) znotraj platoja 2, ki nakazujejo na akuten oksidativni stres, sprememb v zastopanosti antioksidativnih proteinov in proteinov energijskega metabolizma nismo zaznali.



Slika 16: Relativne spremembe v zastopanosti izbranih metabolnih proteinov ob določenih časih inkubacije. Podatki so prikazani kot razmerje med normaliziranimi volumni. Proteini so upoštevani kot diferencialno izraženi, če je razmerje med normaliziranimi volumni glede na referenčni gel večje od 2 ter statistično značilno (Studentov test, $p < 0,05$). Proteinov, ki so v legendi označeni z zvezdico (*) pri času 504 h nismo več detektirali.

Figure 16: Relative changes in the abundance of selected metabolic proteins at the defined times. Data are expressed as fold-changes (FC), which were considered significant if the intensity of the corresponding spot differed reproducibly by more than two-fold in the normalized volume between the corresponding time point and the zero time point, and if statistical significance was shown (Student's t -test, $p < 0.05$). Proteins which are in legend marked with asterisks (*) were not detected at 504 h.

Vzrok za vzdrževanje dinamičnega ravnotežja bi lahko bil v povečanemu obratu proteinov. Vzdrževanje homeostaze proteinov je v običajnih in stresnih pogojih ključnega pomena za funkcionalnost in preživetje celic. Pri vzdrževanju homeostaze proteinov imajo glavno vlogo šaperoni in od ATP odvisne proteaze (Langer in sod., 2001). Poškodbe, ki jih ROS povzročajo na proteinih so kovalentne narave, zato je proteoliza poškodovanih proteinov v času oksidativnega stresa glavni proces, ki ščiti celice ter zagotavlja nadzor kakovosti proteinov (Grune in sod., 1997). Bender in sod. (2010) so v izoliranih mitohondrijih preučevali, kako so oksidativno poškodovani mitohondrijski proteini občutljivi na razgradnjo ter ugotovili, da sta dve skupini proteinov še posebej dovzetni za proteolitično razgradnjo. Ti dve skupini proteinov sta encimi z antioksidativnimi lastnostmi, ki so vpleteni v detoksifikacijo kisikovih radikalov ter proteini s Fe/S prostetično skupino.



Slika 17: Relativne spremembe v zastopanosti izbranih antioksidativnih proteinov ob določenih časih inkubacije. Podatki so prikazani kot razmerje med normaliziranimi volumni. Proteini so upoštevani kot diferencialno izraženi, če je razmerje med normaliziranimi volumni glede na referenčni gel večje od 2 ter statistično značilno (Studentov test, $p < 0,05$).

Figure 17: Relative changes in the abundance of selected antioxidant proteins at the defined times. Data are expressed as fold changes (FC), which were considered significant if the intensity of the corresponding spot differed reproducibly by more than two-fold in the normalized volume between corresponding the corresponding time point and the zero time point, and if statistical significance was shown (Student's t-test, $p < 0.05$).

Raziskave kažejo tudi, da v celicah, ki so izpostavljene vodikovemu peroksidu pride do oksidativnih poškodb metabolnih in antioksidativnih encimov, kot sta Tdh2 in Tdh3 izoencima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, fosfoglicerat mutaza, triozafosfat izomeraza in Cu/Zn-superoksid dismutaza. Cryne in sod. (2003) so namreč dokazali, da se v celicah v času oksidativnega stresa, povzročenga z menadionom, dinamično ravnotežje Cu/Zn superoksid dismutaze vzdržuje s pomočjo povečanega proteinskega obrata. Ker so celice v stacionarni fazi rasti neprestano izpostavljene endogeno nastalim ROS, je proteinski obrat poškodovanih molekul ključnega pomena za vzdrževanje oz. preživetje celic (Marques in sod., 2006). Najverjetneje je proteinski obrat nekaterih identificiranih proteinov v inkubacijskih časih platoja 2 višji v primerjavi s platojem 1.

V splošnem je vzorec sinteze proteinov oz. profil proteinov povečini tekom dvotedenske inkubacije nespremenjen (Sliki 14 in 15). Najizrazitejše spremembe so opazne v času inkubacije 504 ur, ko je raven nekaterih proteinov znižana oziroma jih z 2-D elektroforezo nismo več zaznali (Ald6, Tdh3, Pdc1, Pgc). Poudariti moramo, da dejstvo, da nekaterih proteinov nismo zaznali, ni nujno posledica razgradnje proteinov, temveč je lahko posledica modifikacije, ki spremeni njihovo lokacijo, največkrat zaradi spremenjene izoelektrične točke (Bender in sod., 2010). O podobnih proteinskih profilih oz. vzorcih sintetiziranih proteinov v *S. cerevisiae* ob različnih časih tekom treh tednov stacionarne faze rasti so že poročali. Rezultati nakazujejo na to, da imajo najverjetneje mnogi od teh proteinov vlogo hišnih oz. vzdrževalnih proteinov in da je relativno majhen delež proteinov, ki imajo specifične funkcije (Fuge in sod., 1994).

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili na celičnem in proteomskem nivoju lahko zaključimo, da je kultura, ki smo jo inkubirali v pufru PBS 96 do 192 ur (plato 1) ustrezen model. Znotraj tega časovnega intervala celice izkazujejo največjo stabilnost predvsem v nivoju znotrajcelične oksidacije, ki se posledično izrazi tudi v celični energijski metabolni aktivnosti. Pomembno je namreč, da so celice v dobrem stanju, da uspejo vzdrževati ravnotežje med antioksidanti in oksidanti ter tako preprečiti oksidativen stres. Postavljeni model kvasovke je primeren za preučevanje vpliva različnih okoljskih stresnih dejavnikov na redoks status in energijsko metabolno aktivnost.

4.2 VPLIV EKSOGENIH ANTIOKSIDANTOV NA ENDOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM

V okviru doktorskega dela smo preučevali vpliv eksogenih antioksidantov na endogeni antioksidativni obrambni sistem na celični in molekularni ravni z uporabo enostavnega evkariontskega modelnega organizma kvasovke *S. cerevisiae*. Kulturo kvasovke smo najprej namnožili do stacionarne faze rasti v gojišču YEPD, nato je sledila inkubacija celic v pufru PBS, kjer je potekalo tretiranje z antioksidanti in oksidanti. Celice smo najprej tretirali z različnimi antioksidanti (lipofilni, hidrofilni) določen čas, sledila je izpostavitve induktorju oksidativnega stresa.

Vpliv predtretiranja z antioksidanti kot tudi naknadne izpostavitve induktorju oksidativnega stresa smo na celični ravni preverili z merjenjem: znotrajcelične oksidacije, celične energijske metabolne aktivnosti ter kultivabilnosti. Na molekularni ravni smo se osredotočili na raven proteinov. Določali smo aktivnost superoksid dismutaze in proteasoma, vsebnost neencimskih endogenih sistemov (glutaciona), oksidativne poškodbe proteinov ter splošno spremembo v proteinskem profilu po tretiranjih kulture z uporabo 2-D PAGE.

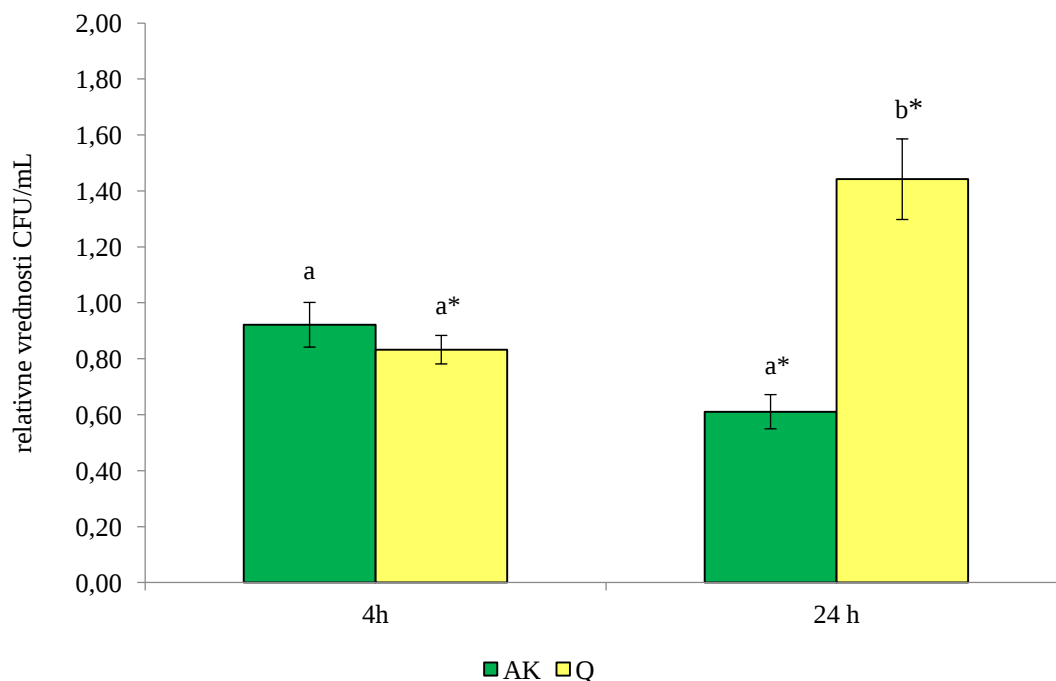
4.2.1 Kultivabilnost

Ko antioksidativni obrambni sistemi niso zmožni preprečiti kopičenja ROS, pride do oksidativnega stresa, ki lahko vodi do resnih oksidativnih poškodb makromolekul ter posledično ogrožanja živosti celic (Sies, 1991a; Halliwell in Cross, 1994; Halliwell in Gutteridge, 2007). V celicah kvasovk je izražen omejen nabor antioksidantov, ki učinkovito ščiti celice pred ROS, ki se tvorijo v danih pogojih rasti. Vendar pa ta osnovni nabor antioksidantov ne ščiti celic, pred nenadno spremembo fizikalno kemijskih pogojev rasti, ki imajo negativen učinek na rast celic, zato morajo kvasovke te spremembe zaznati ter sprožiti hiter odziv na povečan nastanek ROS s povečano aktivnostjo in sintezo že prisotnih antioksidantov. Sprožijo se zgodnji stresni odgovori, ki nudijo takojšnjo zaščito celic pred subletalnimi stresnimi pogoji ter vključujejo spremembe v aktivnosti že obstoječih encimov s posttranslacijskimi modifikacijami in prenos stresnih signalov ter posledično aktivacijo transkripcijskih faktorjev, ki sprožijo pozne odgovore (sintezo stresnih proteinov in antioksidativnih obrambnih sistemov). Pozni odgovori nudijo učinkovito zaščito proti močnemu stresu s sintezo in aktivacijo antioksidativnega obrambnega sistema, ki lovi ROS in popravlja oksidirane biomolekule ter ponovno vzpostavi redoks ravnotežje (Gasch in sod., 2000; Temple in sod., 2005; Costa in Moradas Ferreira, 2001). Vzdrževanje redoks homeostaze je za živost celic, ki so v fazi mirovanja (G_0 faza) zelo pomembno (Gray in sod., 2004). Redoks ravnotežje lahko poleg ROS porušijo tudi eksogeni antioksidanti. Pri visokih koncentracijah delujejo namreč

prooksidativno, poleg tega pa reagirajo tudi z ROS, ki so prisotne v fizioloških koncentracijah potrebnih za optimalno funkcioniranje celic (Martin in Barrett, 2002).

Ker eksogeni antioksidanti lahko vplivajo na redoks homeostazo ter posledično živost oz. kultivabilnost celic, smo najprej preverili kako na kultivabilnost kulture vplivata L-askorbinska kislina in kvercetin. Kultivabilnost smo določali po 4 in 24 urah od dodatka antioksidanta kulturi. Naši rezultati kažejo, da je kultivabilnost celic po 4 urah od dodatka kvercetina v primerjavi s kontrolo nižja za 17 % ter po 24 urah višja za 44 %. Kultivabilnost kulture po 4 urah od dodatka askorbinske kisline je enaka kontroli ter po 24 urah nižja za 39 % (Slika 18).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da 0,2 mM koncentracija kvercetina s časom ugodno deluje na kultivabilnost celic. To lahko podpremo z raziskavo, v kateri so na kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* preučevali vpliv kvercetina na odpornost proti oksidativnemu stresu in dolgoživost kvasovk ter ugotovili, da kvercetin podaljša kronološko življenjsko dobo. Največje razlike v živosti tretirane kulture in kontrole so ugotovili ravno v prvih treh dneh tretiranja (Belinha in sod., 2007). Veliko študij o vplivu kvercetina je bilo narejenih tudi na celičnih kulturah rakavih celic. Večina jih poroča o njegovi citotoksičnosti pri višjih koncentracijah, in sicer nekaj deset μM (Chien in sod., 2009; Soria in sod., 2010; Priyadarsini in sod., 2010; Chou in sod., 2010; Seibert in sod., 2011). V nekaterih primerih naj bi bila citotoksičnost kvercetina odvisna od tipa celic (Brisdelli in sod., 2007; Staedler in sod., 2011). Nekatere študije poročajo o citotoksičnosti kvercetina zaradi njegovega prooksidativnega delovanja (Nemeikaite-Ceniene in sod., 2005), medtem ko v drugih raziskavah mehanizmi, ki so vpleteni, niso pojasnjeni. Dokazali so tudi, da nižje koncentracije kvercetina ($< 50 \mu\text{M}$) zaradi antioksidativnega delovanja ne zmanjšajo živosti celic (Kessler in sod., 2003; Kim in Jang, 2009). V našem primeru smo uporabili veliko višjo koncentracijo kvercetina, ki pa kljub temu ni zmanjšala števila kultivabilnih celic. To je verjetno posledica uporabe *S. cerevisiae* kot modelnega organizma. Kvasovke imajo celično steno, ki je v primerjavi z membrano za nekatere bioaktivne komponente težje prehodna. Tako so tudi Belinha in sod. (2007) pri preučevanju vpliva kvercetina na odpornost proti oksidativnemu stresu in dolgoživost kvasovk uporabili kvercetin v koncentraciji 0,1 mg/mL. Celice kvasovk v stacionarni fazi rasti pa so še bolj odporne na tretiranje z bioaktivnimi komponentami, poleg tega pa imajo tudi odebeljeno celično steno (De Nobel in sod., 2000; Gray in sod., 2004).



Slika 18: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na kultivabilnost kvasovke *S. cerevisiae* 4 oz. 24 ur po dodatku. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih vrednosti CFU/mL glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj treh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

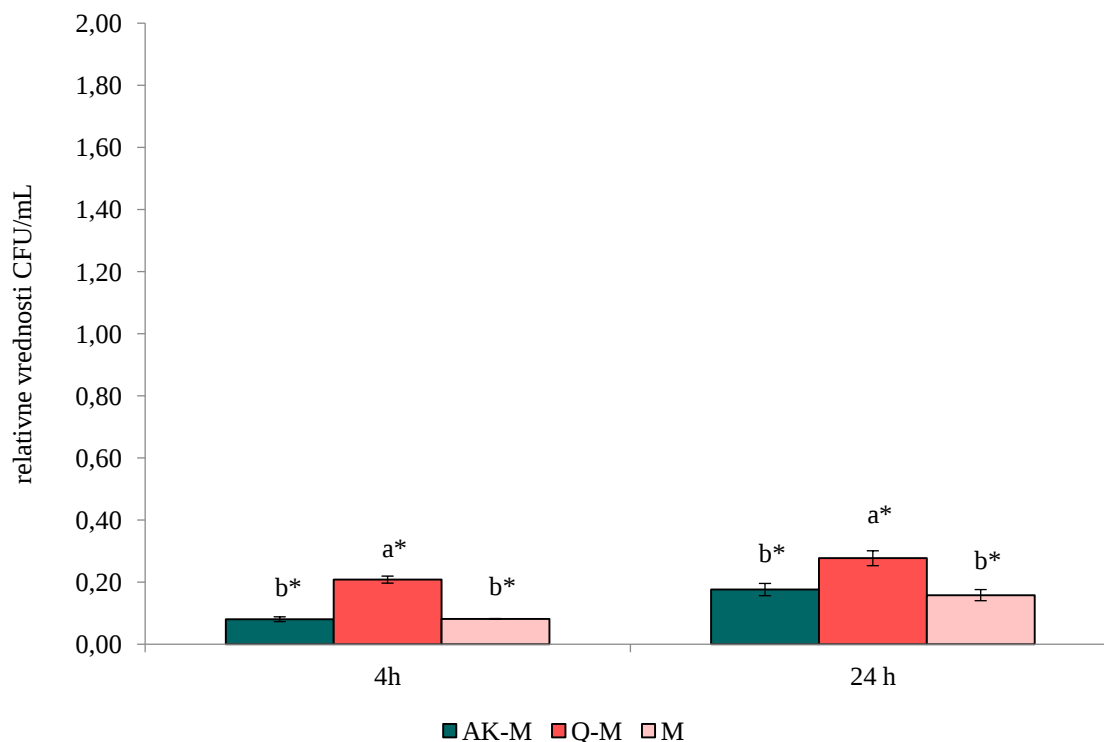
Figure 18: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) on yeast *S. cerevisiae* cultivability after 4 and 24 hours of supplementation. Results are expressed as mean relative values of CFU/mL regarding control $\pm$ sd from at least three independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

V nasprotju s kvercetinom pa askorbinska kislina po daljšem času kultivabilnost zniža. O citostatičnem oziroma citotoksičnem delovanju askorbinske kisline je narejenih veliko raziskav. Chen in sod. (2005b, 2008) so v svojih raziskavah ugotovili, da so rakave celice veliko bolj občutljive na z askorbinsko kislino povzročeno toksičnost kot normalne celice. Rakave celice so na askorbinsko kislino bolj občutljive zato, ker imajo v primerjavi z normalnimi celicami slabše endogene antioksidativne sisteme ter povečano količino ROS (Schafer in Buettner, 2001; Liu in sod., 2004; Oberley, 2005). Askorbinska kislina citotoksično deluje pri visokih koncentracijah, in sicer najverjetneje zaradi prooksidativnega delovanja (Schwartz, 1996; Varadharaj in sod., 2005). Natančen mehanizem, s katerim povzroča citotoksičnost ni poznan. Veliko raziskav poroča o prooksidativnem delovanju askorbinske kisline v prisotnosti kovinskih ionov kot npr. železovih in bakrovih ionov. Askorbinska kislina je odličen reducent, ki reducira Fe^{3+} v Fe^{2+} . Fe^{2+} ioni lahko reagirajo s kisikom ter tvorijo superoksidni anion, ki dismutira v vodikov peroksid in kisik ali pa v klasični Fenton reakciji reagirajo z vodikovim

peroksidom ter tvorijo Fe^{3+} ione ter močno reaktiven hidroksilni radikal (Halliwell, 1999b; Frei in Lawson, 1998; Buettner in Jurkiewicz, 1996).

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali predtretiranje celic z antioksidanti pripomore k ohranitvi redoks homeostaze in posledično kultivabilnosti po naknadnemu dodatku induktorja oksidativnega stresa. Za primerjavo smo uporabili kulturo, ki smo jo namesto z antioksidanti predtretirali s PBS. Za sprožitev oksidativnega stresa smo uporabili menadion. Menadion (2-metil-1,4-naftokinon) je v celicah vključen v redoks kroženje. Pri prejetju enega elektrona, katerega vir je največkrat mitohondrijska respiratorna veriga nastane radikal semikinona. Ta se zaradi nestabilnosti ob prisotnosti kisika avtooksidira, pri tem pa se tvori superoksidni anion in kinon. Zaradi dismutacije in Fenton reakcije se iz $\text{O}_2^{\bullet-}$ tvori vodikov peroksid in hidroksilni radikal (De Groot in sod., 1985; Chung in sod., 1999).

Zaradi stresa povzročenega z menadionom je opazen močan padec v kultivabilnosti, vendar pa je ta padec manjši v primeru predtretiranja celic s kvercetinom. Zaradi 4-urnega predtretiranja celic je bila kultivabilnost za 13 % večja ter zaradi 24-urnega predtretiranja 12 % (Slika 19). Tako je 4-urno predtretiranje pripomoglo k 2,5-krat večji, 24-urno predtretiranje pa k 1,7-krat večji kultivabilnosti. Potrebno je poudariti, da z metodo določanja živosti preko štetja kolonij, določimo le celice, ki so kultivabilne, torej sposobne rasti in razmnoževanja. Število živih celic je najverjetneje večje, saj so v populaciji tudi take, ki svoj metabolizem usmerijo v indukcijo stresnih odgovorov zaradi stresa povzročenega z menadionom in ne v rast. Na osnovi tega lahko rečemo, da zmanjšano število kolonij na ploščah ni nujno povezano z umrljivostjo celic. To dokazuje tudi študija, ki so jo izvedli Kim in sod. (2011b) na kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. Po izpostavitvi kulture 0,6 mM menadionu so v presledku 30 min dve uri spremljali živost celic. Po enourni izpostavitvi menadionu je preživelost v primerjavi s kontrolo padla za 25 %. Ko so merili živost po 2-urni inkubaciji z menadionom pa je bila živost primerljiva s kontrolo. Pri merjenju živosti celic je torej pomemben čas, ki ga celice potrebujejo za vzpostavitev redoks homeostaze. Naši rezultati kažejo, da na vzdrževanje redoks homeostaze ugodneje deluje predtretiranje s kvercetinom, saj je kultivabilnost v primerjavi s kulturo, ki predhodno ni bila tretirana večja, medtem ko je kultivabilnost v primeru predtretiranja z askorbinsko kislino enaka kulturi, ki predhodno ni bila tretirana (Slika 19). Na izmerjeno razliko v kultivabilnosti celic, ki so bile predtretirane s kvercetinom in celicami, ki niso bile, lahko vplivajo številni parametri. Študije namreč kažejo, da je učinek predtretiranja odvisen od koncentracije kvercetina, časa izpostavljenosti ter izbranega organizma (Oztopcu-Vatan in sod., 2009). Razlika v kultivabilnosti predtretirane kulture in kulture, ki ni bila predtretirana pomeni, da je redoks ravnotežje kulture, ki ni bila predtretirana precej porušeno in večina celic usmerja svoj metabolizem v vzpostavitev ravnotežja in ne v rast.



Slika 19: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-manadionu (M) na kultivabilnost kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih vrednosti CFU/mL glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj dveh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Figure 19: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) pretreatment for 4 and 24 hours and subsequent application of stress inductor-menadione (M) on yeast *S. cerevisiae* cultivability. Results are expressed as mean relative values of CFU/mL regarding control $\pm$ sd from at least two independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

4.2.2 Znotrajcelična oksidacija in celična energijska metabolna aktivnost

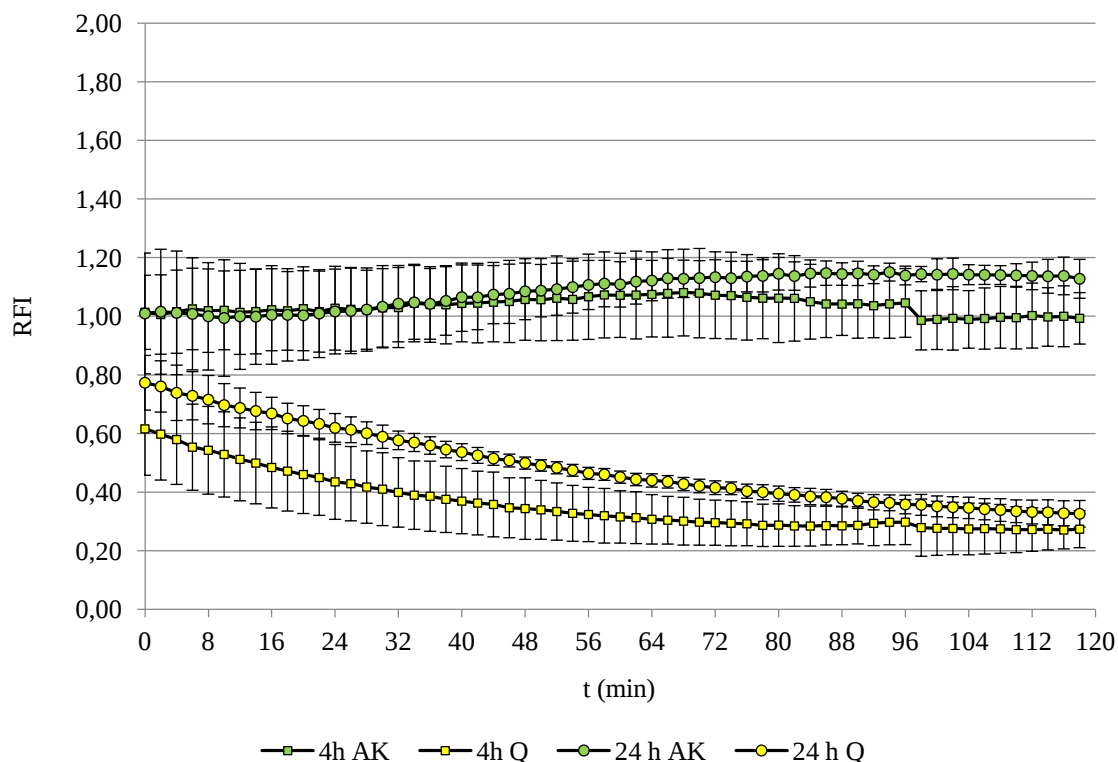
Da bi ugotovili, ali je zmanjšana kultivabilnost res posledica porušenega redoks ravnotežja in usmerjanja energije v vzpostavitev ravnotežja, smo v celicah izmerili znotrajcelično oksidacijo in celično metabolno aktivnost.

Z merjenjem znotrajcelične oksidacije smo dobili odgovor na vprašanje, kako eksogeni antioksidanti vplivajo na nivo ROS v celicah ter ali zaščitijo celice pred ROS, ki nastanejo zaradi naknadne izpostavitve induktorju oksidativnega stresa-menadionu. Antioksidativno učinkovitost eksogenih antioksidantov smo preverili s kinetičnim merjenjem znotrajcelične oksidacije z uporabo barvila H_2DCFDA . Nepolarno barvilo prehaja preko membran. Znotraj celic ga nespecifične esterase deacetilirajo do H_2DCF , ki se zaradi polarne narave

zadržuje v celici, kjer postane tarča ROS, ki ga oksidirajo do fluorescentne oblike (DCF). Diklorofluorescein, ki smo ga uporabili za merjenje znotrajcelične oksidacije se uporablja za splošno oceno znotrajcelične oksidacije (ne za določanje posameznih vrst ROS), ker reagira z $\text{HO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$ ter reaktivnimi dušikovimi zvrstmi kot sta $\text{NO}^\bullet$ in ONOO^- , vendar pa je kljub temu močno občutljiv na oksidacijo z H_2O_2 (Gomes in sod., 2005; Wang in Joseph, 1999; Crow, 1997). Intenziteta fluorescence je merilo znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997). Višja intenziteta fluorescence pomeni višjo znotrajcelično oksidacijo in posledično slabšo antioksidativno učinkovitost eksogenega antioksidanta.

V primeru askorbinske kisline je bila znotrajcelična oksidacija tako po 4 urah od dodatka kot tudi 24 ur po dodatku askorbinske kisline ves čas merjenja enaka kontroli (Slika 20). Askorbinska kislina velja za odličen antioksidant zaradi nizkega redoks potenciala ter nereaktivnosti askorbilnega radikala (semidehidroaskorbinske kisline) (Halliwell, 1999b; Tsao, 1997). Iz rezultatov lahko sklepamo, da se antioksidativno delovanje askorbinske kisline v našem primeru ne kaže v lovljenju prostih radikalov ali da deluje prooksidativno. V primeru prooksidativnega delovanja lahko iz merjenj znotrajcelične oksidacije sklepamo, da so celice nanj že odgovorile z indukcijo stresnih odgovorov ter znižale nivo ROS na raven kontrole. Askorbinska kislina je sicer učinkovit lovalec superoksidnega aniona (Nishikimi, 1975; Jackson in sod., 1998), peroksinitrita (Squadrito in sod., 1995), hidroksilnega, alkoksilnega in peroksilnega radikala (Buettner, 1993), ne pa tudi vodikovega peroksida (Nishikimi, 1975). Upoštevajoč to dejstvo, nespremenjena znotrajcelična oksidacija v primerjavi s kontrolo ni nujno posledica neučinkovitega lovljenja ROS s strani askorbinske kisline, temveč večje občutljivosti reagenta na H_2O_2 v primerjavi z ostalimi ROS.

Znotrajcelična oksidacija kulture, ki je bila predtretirana s kvercetinom pa se je tako 4 kot tudi 24 ur po dodatku močno znižala (Slika 20). To nakazuje na zmožnost kvercetina, da zniža nivo reaktivnih kisikovih zvrsti v celicah ter na njegovo učinkovitost v lovljenju prostih radikalov. Njegova učinkovitost v lovljenju prostih radikalov se skriva v strukturi molekule. Ima hidroksilni skupini na mestih 3 in 5, orto-dihidroksi oziroma kateholno skupino na obroču B ter 2,3-dvojno vez v obroču C (Silva in sod., 2002; Bors in sod., 1990). Ker sta hidroksilni skupini kateholne strukture donorja elektronov, je kvercetin močan lovalec prostih radikalov (Bors in sod., 1990; Rice-Evans in sod., 1996). Dokazali so, da je kvercetin poleg miricetina najučinkovitejši lovalec prostih radikalov (Rice-Evans in sod., 1996). Znižanje ravni intracelularnih ROS brez indukcije oksidativnega stresa in antioksidativno delovanje kvercetina so dokazali tudi v A549 rakavih celicah pljuč (Robaszkiewicz in sod., 2007) ter U937 celicah (Ferraresi in sod., 2005).



Slika 20: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na nivo znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* 4 oz. 24 ur po dodatku. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih fluorescenčnih intenzitet (RFI) glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj treh neodvisnih eksperimentov.

Figure 20: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) on yeast *S. cerevisiae* intracellular oxidation level after 4 and 24 hours of supplementation. Results are expressed as mean relative fluorescence intensities (RFI) regarding control $\pm$ sd from at least three independent measurements.

Poleg direktnega lovljenja ROS, flavonoidi poškodbe povzročene zaradi ROS preprečujejo tudi z aktivacijo antioksidativnih encimov (Nijveldt in sod., 2001), z vezavo kovin (Ferrali in sod., 1997), redukcijo α -tokoferilnih radikalov (Hirano in sod., 2001; Heim in sod., 2002), inhibicijo oksidaz (Heim in sod., 2002; Cos in sod., 1998), zmanjšanjem oksidativnega stresa, ki ga povzroči dušikov oksid (van Acker in sod., 1995) ter s povečanjem antioksidativnih lastnosti nizkomolekularnih antioksidantov (Yeh in sod., 2005). Z vsemi temi mehanizmi antioksidativnega delovanja lahko prispevajo k znižanju nastajanja ROS.

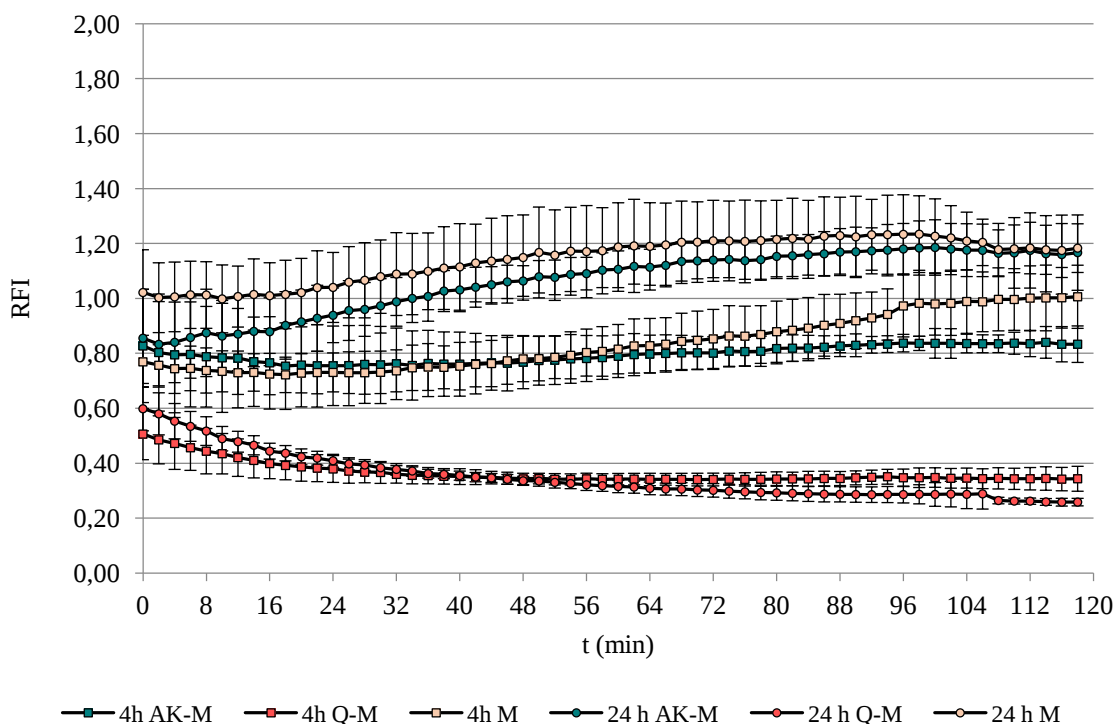
Nivo ROS kulture, predtretirane s kvercetinom, se je v primerjavi s količino ROS kulture, ki predhodno ni bila tretirana močno znižala (Slika 21). V primeru askorbinske kisline tega zmanjšanja nismo opazili. Nivoja znotrajcelične oksidacije kulture predtretirane z askorbinsko kislino in kulture, ki predhodno ni bila tretirana sta enaka (Slika 21). Nivoja znotrajcelične oksidacije kultur, ki predhodno nista bili tretirani (ne 4 ne 24 ur) rahlo naraščata ter se proti koncu merjenja približujeta vrednostim kontrole (Slika 21).

Nivo znotrajcelične oksidacije nakazuje na to, da so se celice v kulturi v času dvournega tretiranja z menadionom uspešno odzvale na dodatek menadiona. V študiji, v kateri so preučevali adaptivni stresni odziv kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 na menadion prav tako poročajo o povečani tvorbi ROS. Navajajo tudi, da je nivo znotrajcelične oksidacije odvisen od časa merjenja. Znotrajcelično oksidacijo so merili dve uri v intervalu 30 min. V času 60 min po dodatku menadiona je nivo znotrajcelične oksidacije naraščal, nato pa se je počasi zniževal proti nivoju, ki so ga izmerili pred dodatkom menadiona (Kim in sod., 2011b). Celice kulture, ki smo jo izpostavili menadionu torej težijo k vzpostavitvi redoks ravnotežja, na kar nakazuje tudi oblika krivulje, ki se proti koncu merjenja približuje vrednostim kontrole.

Glede na to, da je bil nivo znotrajcelične oksidacije kulture predhodno tretirane z askorbinsko kislino enak nivoju znotrajcelične oksidacije kulture, ki predhodno ni bila tretirana, lahko sklepamo, da askorbinska kislina v našem primeru ni pripomogla k znižanju znotrajcelične oksidacije. V nasprotju z našimi rezultati druge študije poročajo, da askorbinska kislina zniža količino ROS. V endotelijskih celicah EA.hy96, ki so jih po predhodnem tretiranju z askorbinsko kislino izpostavili menadionu se je količina ROS znižala (May in sod., 2003). Tudi Nardini in sod. (2002) v svoji študiji poročajo, da predtretiranje z askorbinsko kislino zniža nivo znotrajcelične oksidacije v bronhialnih epiteljskih celicah po izpostavitvi akroleinu. Pri preučevanju vpliva antioksidantov proti z para-nonilfenol inducirani inhibiciji celične rasti v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* pa so ugotovili, da askorbinska kislina ne zaščiti celic pred nastajajočimi ROS (Okai in sod., 2000). Askorbinska kislina v kombinaciji z menadionom je citotoksična za rakave celice zaradi nastanka velike količine H_2O_2 (Verrax in sod., 2008). Iz objavljenih raziskav lahko sklepamo, da je delovanje askorbinske kisline odvisno od koncentracije, inkubacijskega časa, tipa celic in ne nazadnje tudi od uporabljene kombinacije antioksidanta in induktorja stresa.

Znotrajcelična oksidacija kulture, ki je bila 4 ure predtretirana s kvercetinom ter nato izpostavljena menadionu je v primerjavi s kontrolo na začetku merjenja močno znižana, tekom merjenja počasi pada ter se proti koncu ustali. Podobno velja tudi za kulturo, ki je bila predtretirana 24 ur. Da kvercetin zniža ROS po izpostavitvi celic induktorju stresa (askorbat/ Fe^{2+}) so dokazali tudi v retinalnih celicah, v katerih je kvercetin zmanjšal intenziteto fluorescence za 2,9-krat (Areias in sod., 2001). Kot učinkovit lovilec prostih radikalov se je izkazal tudi pri znižanju ROS po indukciji oksidativnega stresa z vodikovim peroksidom v celicah *Saccharomyces cerevisiae* v eksponentni fazi rasti (Belinha in sod., 2007) ter po indukciji stresa z APPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorid) in Cu^{2+} v HepG2 celicah (Kim in sod., 2011a). Poleg antioksidativnega, naj bi imel kvercetin tudi prooksidativno delovanje (Laughton in sod., 1989; Metodiewa in Dunford, 1993). Prooksidativnega delovanja z merjenjem znotrajcelične oksidacije nismo zaznali. Način delovanja naj bi bil odvisen od koncentracije in časa delovanja kvercetina ter vira prostih

radikalov (Metodiewa in sod., 1999). Prooksidativno delovanje kvercetina naj bi bilo posledica nastanka škodljivih produktov po reakciji z ROS (Boots in sod., 2003; Metodiewa in sod., 1999) ter tvorbe ROS v ekstracelularnem mediju (Robaszkiewicz in sod., 2007).

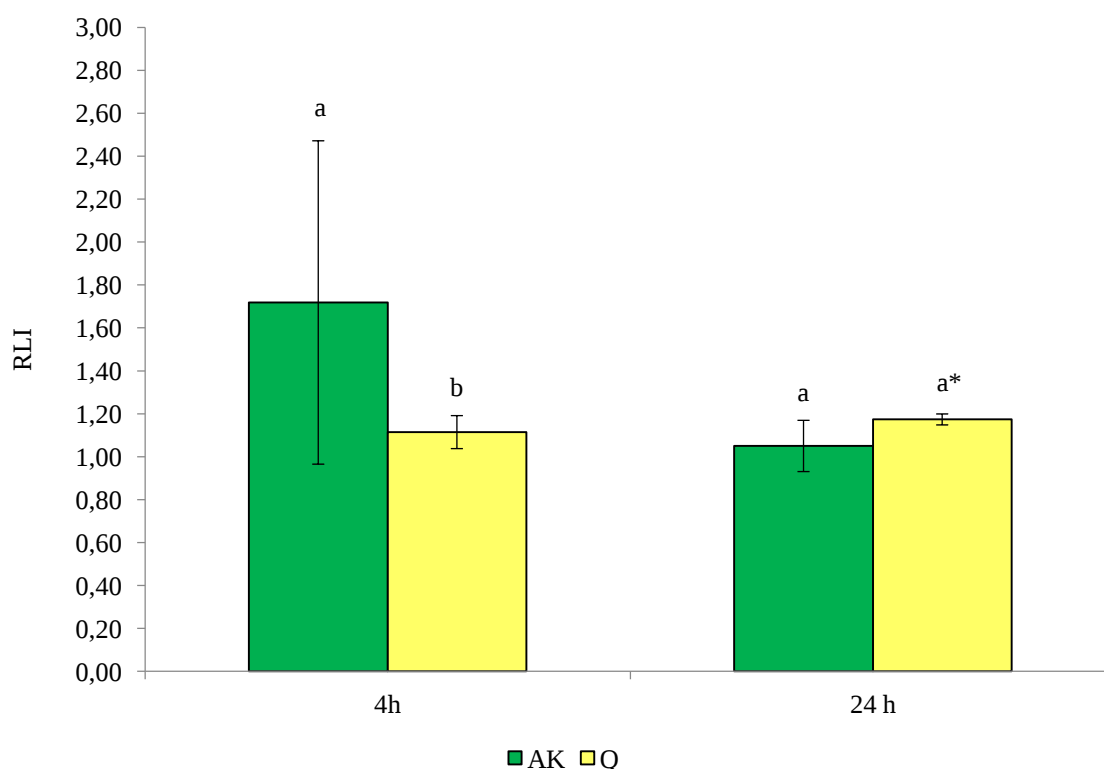


Slika 21: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na nivo znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih fluorescenčnih intenzitet (RFI) glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj dveh neodvisnih eksperimentov.

Figure 21: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) pretreatment for 4 and 24 hours and subsequent application of stress inductor-menadione (M) on yeast *S. cerevisiae* intracellular oxidation level. Results are expressed as mean relative fluorescence intensities (RFI) regarding control $\pm$ sd from at least two independent measurements.

Rothe in Valet (1990) navajata, da so za oksidacijo diklorofluoresceina z vodikovim peroksidom potrebni železovi ioni. Posledično bi lahko v celicah, ki so bile tretirane s kvercetinom izmerili nižji nivo znotrajcelične oksidacije od dejanske. Kvercetin namreč ni samo učinkovit lovilce prostih radikalov temveč tudi kelator železovih ionov (Afanas'ev in sod., 1989). Ker veže železove ione, lahko pride do zmanjšane oksidacije diklorofluoresceina ter posledično do lažno nižje intenzitete fluorescence, ki jo interpretiramo kot nižjo znotrajcelično oksidacijo od dejanske. Kljub temu lahko trdimo, da je večji del znižanja nivoja znotrajcelične oksidacije posledica učinkovitega lovljenja prostih radikalov (Bors in sod., 1994). To pa ni edino protislovno delovanje kvercetina.

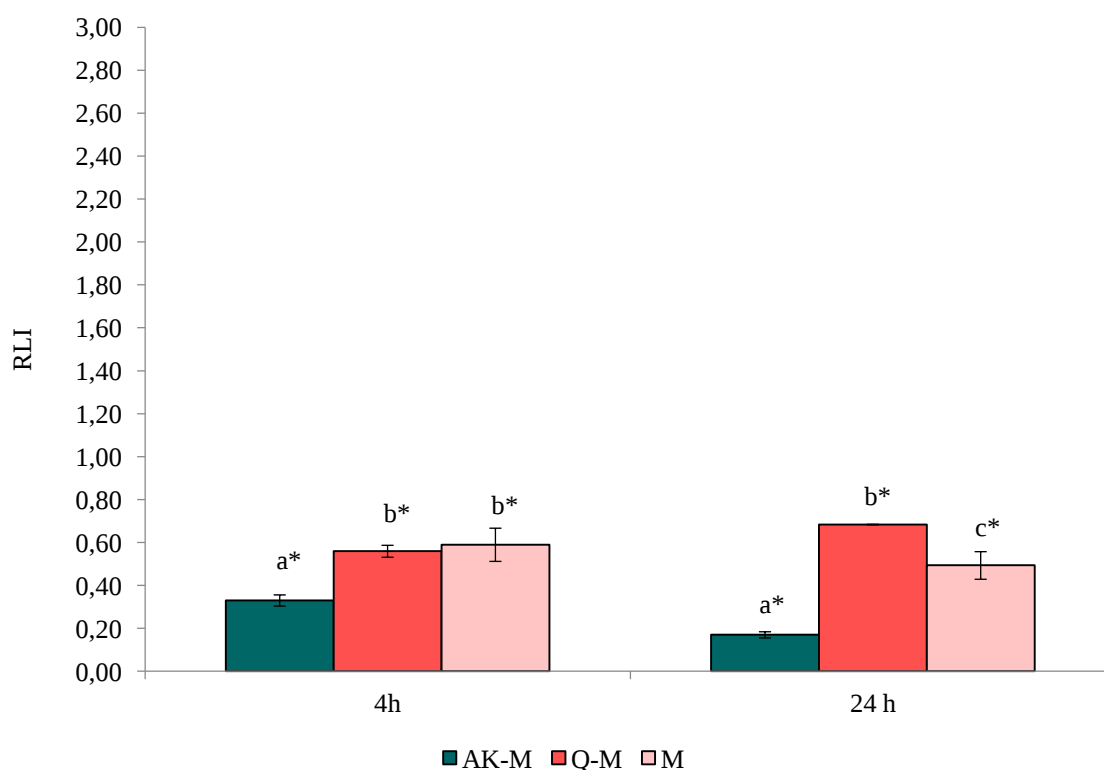
Paradoks kvercetina je v dejstvu, da se ob nevtralizaciji učinka ROS pretvori v reaktiven kinon. Na tak način v celicah prepreči neselektivno toksičnost, ki je posledica delovanja ROS in povzroči selektivno toksičnost zaradi reakcij s tioli glutationa in tioli proteinov (Boots in sod., 2007). Posledice tega paradoksa so usmeritev celičnega metabolizma v odstranitev posledic delovanja selektivne toksičnosti ter v preživetje celic. Parametra, ki kažeta na tovrsten odziv sta kultivabilnost celic in količina razpoložljivega ATP. V pogojih redoks homeostaze, ko so ROS v fizioloških količinah, po tretiranju celic s kvercetinom paradoksa nismo zaznali z nobenim od teh dveh parametrov. Štiri ure po dodatku kvercetina je bila količina razpoložljivega ATP enaka kot pri kontroli, 24 ur po dodatku pa za 17 % višja (Slika 22). V primeru tretiranja kulture z askorbinsko kislino se je količina razpoložljivega ATP štiri ure po dodatku askorbinske kisline povečala, vendar to povečanje ni statistično značilno, 24 ur po dodatku pa je enaka kontroli (Slika 22).



Slika 22: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na energijsko metabolno aktivnost kvasovke *S. cerevisiae* 4 oz. 24 ur po dodatku. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih luminiscenčnih intenzitet (RLI) glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj treh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Figure 22: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) on yeast *S. cerevisiae* energy metabolic activity after 4 and 24 hours of supplementation. Results are expressed as mean relative luminiscence intensities (RLI) regarding control $\pm$ sd from at least three independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

Ko smo celicam po predtretiranju s kvercetinom oz. askorbinsko kislino dodali menadion, sta se pri obeh časih predtretiranja kultivabilnost celic in količina razpoložljivega ATP v primerjavi s kontrolo znižali (Sliki 19 in 23). Znižanje obeh parametrov smo opazili tudi pri kulturi, ki smo jo izpostavili menadionu brez predhodnega tretiranja z antioksidanti. Ko se celice spopadajo s stresnimi pogoji se količina razpoložljivega ATP zniža, ker se porablja za indukcijo antioksidativnih obrambnih sistemov. Ker celice v G_0 fazi nimajo neomejene količine hranil in je količina razpoložljivega ATP v primerjavi s količino ATP ob prisotnosti glukoze nižja (Laporte in sod., 2011), nimajo dovolj energije za rast in preživetje, zato jo usmerijo v slednje.



Slika 23: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na energijsko metabolno aktivnost kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih luminiscenčnih intenzitet (RLI) glede na kontrolo $\pm$ sd treh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b, c), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Figure 23: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) pretreatment for 4 and 24 hours and subsequent application of stress inductor-menadione (M) on yeast *S. cerevisiae* energy metabolic activity. Results are expressed as mean relative luminiscence intensities (RLI) regarding control $\pm$ sd from three independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b, c) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

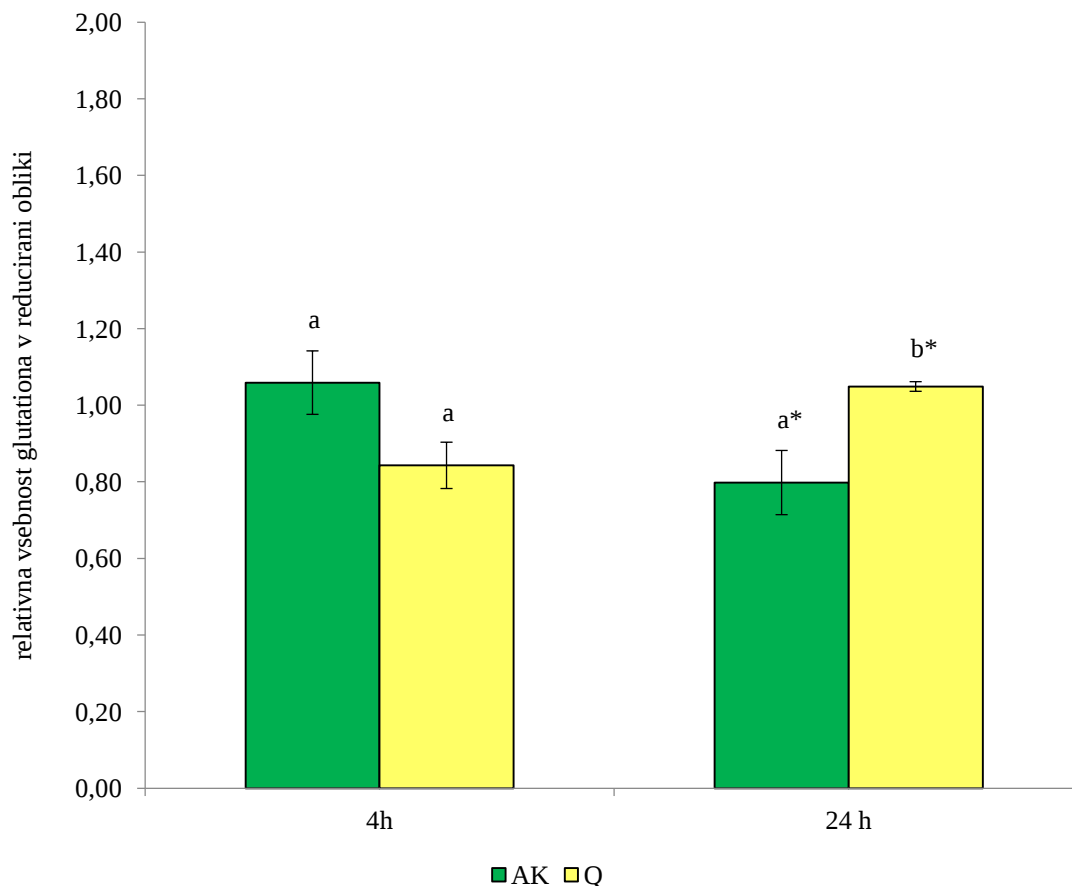
4.2.3 Merjenje vsebnosti glutaciona

Delovanje eksogenih antioksidantov lahko vpliva tudi na endogene antioksidativne sisteme. Enega glavnih ne-encimskih antioksidativnih obrambnih sistemov v celicah predstavlja glutacion. Celicam nudi zaščito z lovljenjem prostih radikalov ter preprečuje elektrofilnim ksenobiotikom reakcijo s celičnimi makromolekulami (Cnubben in sod., 2001). Ker je glavni lovilec prostih radikalov, je njegova vloga pri vzdrževanju redoks ravnotežja v celicah zelo pomembna (Jamieson, 1992; Marchler in sod., 1993). Ker ima nukleofilno tiolno skupino, celice pred toksičnimi substancami ščiti s konjugacijo, ki jo katalizira glutacion S-transferaza, s kemijsko reakcijo z reaktivnimi metaboliti ali z donacijo protona ali vodikovega atoma reaktivnim metabolitom in prostim radikalom (Durgo in sod., 2007). Glutacion tvori tudi konjugate s kinoni kvercetina in menadionom (Boots in sod., 2003; Ross in sod., 1985).

Naši rezultati kažejo, da tretiranje kulture s kvercetinom ni drastično vplivalo na vsebnost glutaciona. Štiri ure po dodatku kvercetina se vsebnost glutaciona statistično ne razlikuje od vsebnosti glutaciona kontrole, medtem ko se je po 24 urah od dodatka vsebnost malenkost povečala (5 %) (Slika 24). Iz naših meritev lahko sklepamo, da se je po 4 urah od dodatka kvercetina vsebnost reducirane oblike glutaciona znižala, vendar znižanje ni statistično značilno, zaradi stalne disociacije konjugatov kvercetin kinon-glutacion (GSQ) v kvercetin kinon (QQ) in glutacion. Zaradi stalne disociacije konjugatov je namreč ponovljivost meritev majhna. Ob dovolj visoki koncentraciji glutaciona, QQ ponovno reagira z glutacionom in tvori GSQ. Glutacion torej celicam nudi zaščito pred kvercetin-kinonom le, ko je njegova koncentracija visoka. Ko je koncentracija GSH nizka, disociiran QQ reagira s preostalimi tioli kot npr. tioli proteinov. To bi lahko nakazovalo na to, da je zaščita, ki jo glutacion nudi celicam pred QQ le prehodna. Glutacion ščiti celice pred QQ na mestu njegovega nastanka v trenutku, ko nastane, vendar pa ga prej ali slej vedno prenese na druge tirole (Boots in sod., 2005). Na to nakazujejo tudi naši rezultati. Štiriindvajset ur po dodatku kvercetina je količina reducirane oblike glutaciona primerljiva s kontrolo, ker QQ najverjetneje tvori konjugate s tioli proteinov, ki so stabilnejši in zato termodinamsko ugodnejši. Kinoni kvercetina sicer nastanejo, vendar zasedejo majhen delež razpoložljivega glutaciona, in sicer zaradi konjugatov, ki jih tvorijo z njim.

Pri tretiranju kulture z askorbinsko kislino 4 ure po dodatku ni bilo spremembe v vsebnosti glutaciona, po 24 urah pa se je vsebnost v primerjavi s kontrolo zmanjšala za 20 % (Slika 24). Askorbinska kislina se po reakciji s prostimi radikali oksidira do dehidroaskorbinske kisline, ki se reducira s pomočjo glutaciona. Večji kot je obseg oksidacije askorbinske kisline, manjša je vsebnost glutaciona. Redukcija dehidroaskorbinske kisline z glutacionom je lahko spontana, največkrat pa jo katalizirajo DHA reduktaze. *Saccharomyces cerevisiae* ima glutacion-S-transferazo Gto2, ki deluje kot DHA reduktaza (Garcerá in sod., 2006). Znižanje vsebnosti glutaciona zaradi dehidroaskorbinske kisline so ugotovili tudi v

raziskavi, v kateri so preučevali, ali je v endotelijskih celicah goveje aorte glutathion potreben za reciklacijo askorbinske kisline (May in sod., 2001).



Slika 24: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na vsebnost reducirane oblike glutathiona kvasovke *S. cerevisiae* 4 oz. 24 ur po dodatku. Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne vrednosti glutathiona v reducirani obliki glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj treh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Figure 24: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) on yeast *S. cerevisiae* glutathione level in reduced form after 4 and 24 hours of supplementation. Results are expressed as mean relative values of glutathione in reduced form, regarding control $\pm$ sd from at least three independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

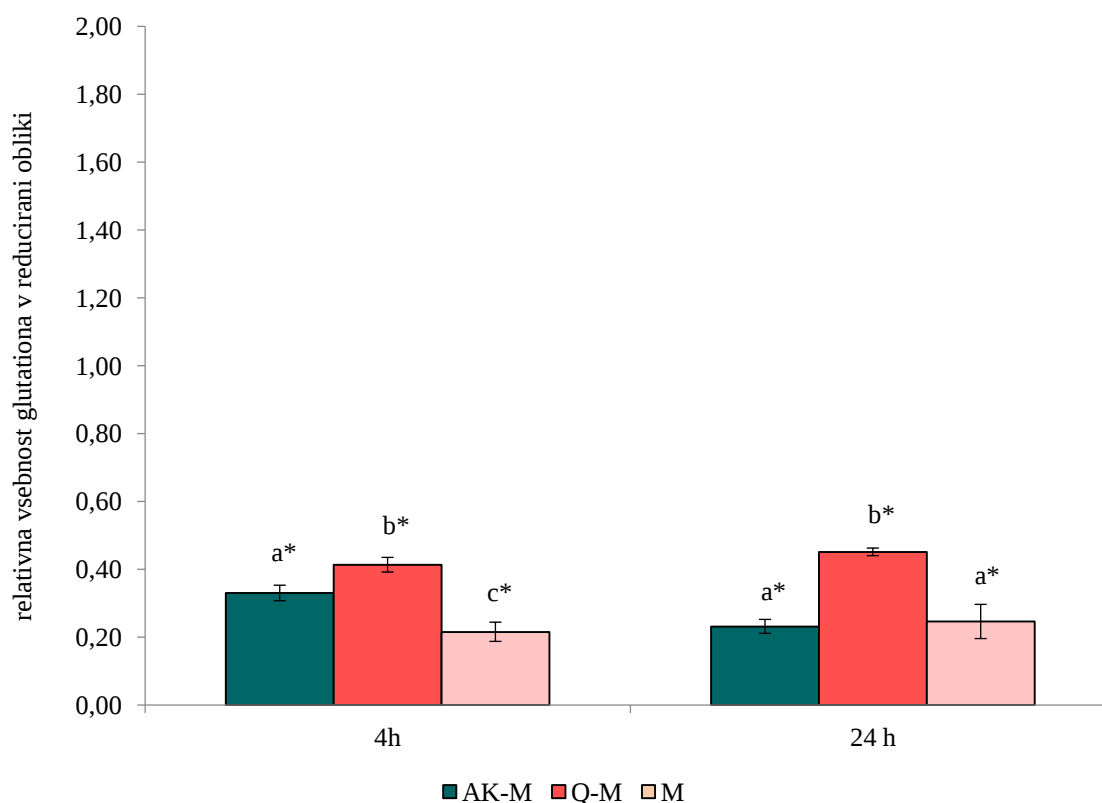
Vsebnost glutathiona se v primeru izpostavitve kulture menadionu zniža, predtretiranje z antioksidanti pa pripomore k delni ohranitvi vsebnosti glutathiona. Pri kulturi, katero smo po 4-urni inkubaciji brez antioksidanta izpostavili menadionu, se je vsebnost glutathiona v primerjavi s kontrolo znižala za 78 %, medtem ko se je pri kulturi, ki je bila brez antioksidanta inkubirana 24 ur znižala za 75 % (Slika 25). V celicah, ki smo jih predhodno 4 ure tretirali s kvercetinom, nato pa izpostavili menadionu, se je vsebnost glutathiona v

primerjavi s kontrolo znižala za 59 %, pri 24 ur predtretiranih celicah pa za 55 % (Slika 25). Glede na to, da je vsebnost glutathiona v predtretirani kulturi skoraj dvakrat višja kot v kulturi, ki predhodno ni bila tretirana, je kvercetin pripomogel k zaščiti celic pred menadionom ter pomagal ohraniti višjo vsebnost glutathiona. Višjo vsebnost glutathiona so dokazali tudi v jetrnih celicah mišk, ki so jih pred oksidativnim stresom, povzročenim z etanolom, tretirali s kvercetinom. Kvercetin naj bi celice ščitil indirektno, in sicer preko indukcije encima glutathion reduktaza, ki katalizira redukcijo oksidirane oblike glutathiona v reducirano (Molina in sod., 2003). Z dodatkom menadiona smo povzročili stres, kar je opazno tudi pri znižanju vsebnosti glutathiona. To znižanje glutathiona je lahko posledica antioksidativnega delovanja glutathiona (kot lovilec ROS) in/ali tvorbe konjugatov menadiona z glutathionom. Močno znižanje vsebnosti celokupnega glutathiona so dokazali tudi v študiji vpliva menadiona na celice *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti. Dokazali so, da znižanje vsebnosti celokupnega glutathiona ni posledica oksidacije reduciranega glutathiona ter izločanje oksidirane oblike, kot je to pri animalnih celicah, temveč, da je to posledica nastanka konjugatov med menadionom in glutathionom (Zadziński in sod., 1998).

Rezultati raziskav, ki preučujejo, kako kvercetin vpliva na vsebnost glutathiona po indukciji stresa z različnimi stresnimi dejavniki so zelo različni. V raziskavi, v kateri so preučevali ali kvercetin zaščiti humane celice retinalnega pigmentnega epitela (RPE) pred oksidativnim stresom poročajo, da vodikov peroksid ni bistveno znižal vsebnosti glutathiona. Prav tako predhodno tretiranje celic s kvercetinom v koncentracijskem območju 1-100 μM ni vplivalo na znotrajcelično vsebnost glutathiona (Kook in sod., 2008). Kim in Jang (2009) poročata, da predtretiranje celic HepG2 s kvercetinom zniža vsebnost glutathiona v primerjavi s kontrolo (HepG2 celice tretirane z vodikovim peroksidom), kljub temu, da tako kot v zgoraj omenjenem primeru sam vodikov peroksid ne vpliva na vsebnost glutathiona. Znižanje vsebnosti glutathiona je bilo odvisno od koncentracije kvercetina.

K nespremenjeni vsebnosti glutathiona po izpostavitvi kulture menadionu je pripomoglo tudi predtretiranje kulture z askorbinsko kislino (Slika 25). Tako je bila vsebnost glutathiona v primerjavi s celicami, ki niso bile predtretirane malenkost višja (za 11 %). Da je znižanje vsebnosti glutathiona v primeru predtretiranja celic z askorbinsko kislino manjše, so dokazali tudi v študiji na endotelijskih celicah EA.hy926 (May in sod., 2003). To nakazuje na to, da kljub temu, da se reducirana oblika glutathiona v celicah porablja za reciklacijo askorbinske kisline iz dehidroaskorbinske kisline očitno askorbinska kislina v odzivu na oksidativni stres pripomore k ohranitvi glutathiona. Pri 24-urnem predtretiranju ni bilo statističnih razlik v vsebnosti glutathiona med predtretiranimi celicami in celicami, ki niso bile predtretirane. Ta rezultat nakazuje na izrabo askorbinske kisline po 24 urah. V organizmih, ki niso sposobni sinteze askorbinske kisline redukcija dehidroaskorbinske kisline (DHA) in semidehidroaskorbinske (SDHA) kisline načeloma lahko pripomore k ohranjanju razpoložljive količine askorbinske kisline. Vendar pa so z raziskavami dokazali,

da se aktivnost encimov, ki reducirajo DHA in SDHA v organizmih, ki sintetizirajo askorbinsko kislino in v tistih, ki je ne morejo, ne razlikuje. Tako najverjetneje razpoložljive količine askorbinske kisline v organizmih ne zagotavlja reciklacija, temveč de novo sinteza ali prevzem iz okolja (Arrigoni in De Tullio, 2002).



Slika 25: Vpliv 4 oz 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na vsebnost reducirane oblike glutathiona kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih vrednosti glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj dveh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b, c), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Figure 25: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) pretreatment for 4 and 24 hours and subsequent application of stress inductor-menadione (M) on yeast *S. cerevisiae* glutathione level in reduced form. Results are expressed as mean relative values regarding control $\pm$ sd from at least two independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b, c) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

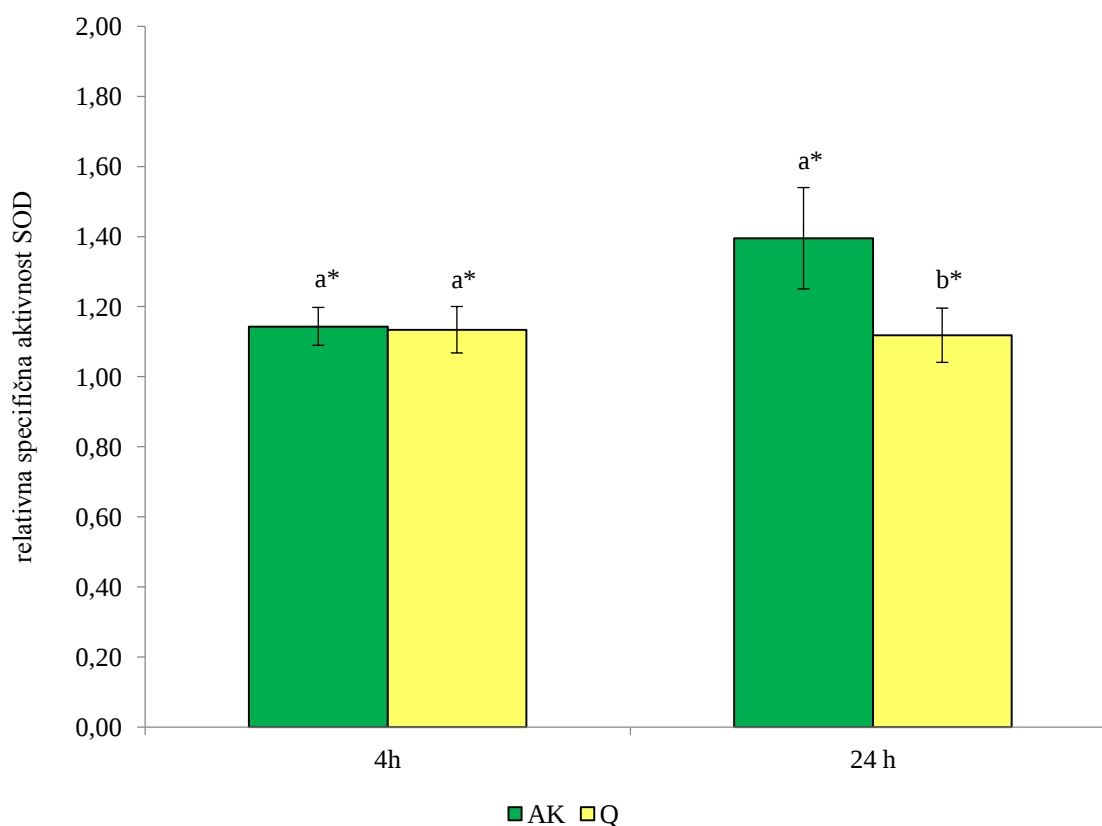
4.2.4 Aktivnost superoksid dismutaze

Superoksid dismutaza katalizira pretvorbo superoksidnega aniona v kisik in vodikov peroksid. Je metaloencim, ki za svojo aktivnost potrebuje kovinske ione (Fridovich, 1995; Culotta in sod., 2006). Tako kot drugi evkarionti, imajo tudi kvasovke dve superoksid dismutazi: mitohondrijsko MnSOD (Sod2) ter citoplazemsko Cu/ZnSOD (Sod1), ki se nahaja tudi v mitohondrijskem intermembranskem prostoru (Culotta in sod., 2006; Sturtz in sod., 2001).

Rezultati kažejo, da se je aktivnost superoksid dismutaze v primerjavi s kontrolo povečala po tretiranju kulture s kvercetinom (za 13 % po 4 urah ter 12 % po 24 urah od dodatka), askorbinsko kislino (za 14 % po 4 urah in 39 % po 24 urah od dodatka) (Slika 26), po tretiranju kulture z askorbinsko kislino ter naknadni indukciji stresa (za 24 % po 4 urah in 27 % po 24 urah predtretiranja) ter po tretiranju kulture z menadionom brez predhodnega tretiranja z antioksidantom (za 13 % po 4 urah ter 23 % po 24 urah) (Slika 27). Aktivnost superoksid dismutaze v celicah predhodno tretiranih s kvercetinom in nato izpostavljenih stresu je primerljiva s kontrolo.

Medtem ko naši rezultati kažejo rahlo povišanje aktivnosti superoksid dismutaze po dodatku kvercetina (12 oz. 13 % po 4 oz. 24 urah po dodatku v primerjavi s kontrolo) (Slika 26), večina raziskav poroča o nespremenjeni aktivnosti SOD. V raziskavi, v kateri so preučevali antioksidativne oziroma prooksidativne učinke kvercetina na humanih rakavih celic pljuč (A549) so ugotovili, da se aktivnost SOD ob dodatku nižjih koncentracij kvercetina vse do 6 ur inkubacije ne spremeni. Pri višjih koncentracijah kvercetina pa so opazili znižanje aktivnosti (Robaszkiewicz in sod., 2007). Nespremenjeno aktivnost SOD so detektirali tudi v raziskavi, kjer so preučevali vpliv kvercetina na celice človeškega hepatoma HepG2 (Alia in sod., 2006). Povišanje aktivnosti superoksid dismutaze v naših raziskavah lahko pojasnimo z nastankom superoksidnega aniona, ki je substrat za SOD. Vir superoksidnega aniona je ciklična reakcija, v kateri zaradi prenosa elektrona iz kvercetin semikinona na kisik nastane superoksid. Produkta reakcije sta kvercetin kinon in superoksidni anion, ki v reakciji s kvercetinom tvori semikinon in vodikov peroksid ali postane substrat za SOD. Navsezadnje pa je superoksidni anion lahko tudi tarča drugih endogenih antioksidantov npr. glutationa. Aktivnost SOD se zaradi nastanka superoksidnega aniona verjetno poveča le v manjši meri, saj so Sassi in sod. (2012) dokazali, da kvercetin povzroči nastanek zelo majhne količine superoksidnega aniona. V našem primeru je povišana SOD aktivnost delno najverjetneje tudi posledica načina merjenja aktivnosti superoksid dismutaze. Metoda namreč temelji na dejstvu, da superoksid dismutaza inhibira redukcijo WST-1. Če je superoksid dismutaza prisotna, katalizira dismutacijo superoksidnega aniona ter tako prepreči redukcijo WST-1 s superoksidnimi anioni. Vendar pa so v sveže pripravljenih ekstraktih za merjenje superoksid dismutazne aktivnosti prisotni tudi drugi lovilci superoksidnega aniona (npr.

GSH in kvercetin), ki lahko prispevajo k izmerjeni višji aktivnosti encima superoksid dismutaze. V vzorcih, ki so bili po predtretiranju s kvercetinom izpostavljeni menadionu, kvercetin najverjetneje ne prispeva k višji izmerjeni aktivnosti superoksid dismutaze, saj je večji del antioksidanta v oksidirani obliki torej v obliki kinonov.



Slika 26: Vpliv kvercetina in askorbinske kisline na aktivnost superoksid dismutaze kvasovke *S. cerevisiae* 4 oz. 24 ur po dodatku. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih specifičnih aktivnosti glede na kontrolo $\pm$ sd vsaj dveh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Figure 26: Effect of quercetin and ascorbic acid on yeast *S. cerevisiae* superoxide dismutase activity after 4 and 24 hours of supplementation. Results are expressed as mean relative specific activities $\pm$ sd from at least two independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

Aktivnost superoksid dismutaze se je povečala tudi po tretiranju z askorbinsko kislino, in sicer v primerjavi s kontrolo za 14 % po 4 urah od dodatka in za 39 % po 24 urah od dodatka (Slika 26). Povečano aktivnost superoksid dismutaze so ugotovili tudi v limfocitih, ki so jih izolirali iz posameznikov, ki so uživali vitamin C (Khassaf in sod., 2003). Vzrok za povečanje aktivnosti superoksid dismutaze bi lahko bilo prooksidativno delovanje

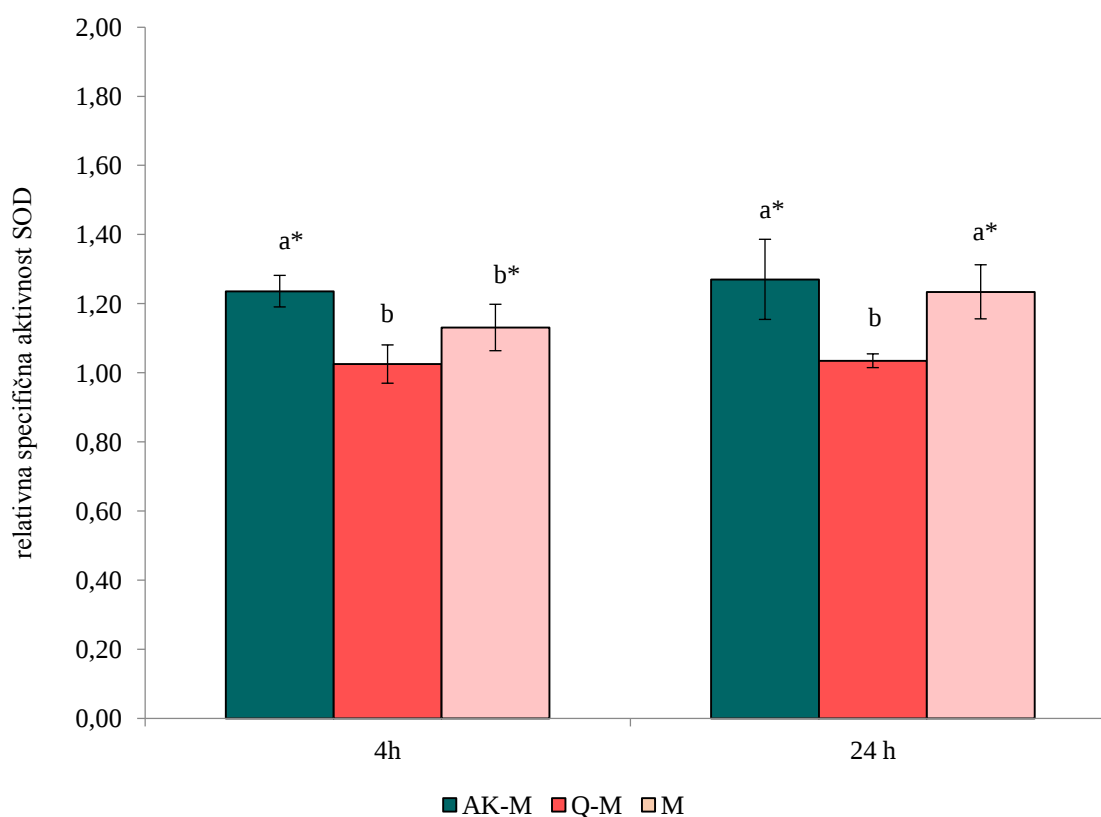
askorbinske kisline. Askorbinska kislina kot odličen reducent, reducira Fe^{3+} ione v Fe^{2+} . Slednji reagirajo s kisikom ter tvorijo superoksidni anion, ki ga superoksid dismutaza dismutira v vodikov peroksid in kisik (Halliwell, 1999b; Frei in Lawson, 1998; Buettner in Jurkiewicz, 1996). Zaradi prooksidativnega delovanja askorbinske kisline nastane večja količina superoksidnega aniona, zaradi česar se poveča aktivnost superoksid dismutaze.

Povečana aktivnost superoksid dismutaze pri kulturi tretirani z menadionom (Slika 27) je posledica nastanka superoksidnih anionov, katerih nastanek povzroči menadion. Povišanje aktivnosti je najverjetneje posledica povečanja aktivnosti citosolne Cu/ZnSOD. Citosolna superoksid dismutaza je namreč zelo stabilna, odporna na segrevanje, proteolizo ter denaturacijo z nekaterimi reagenti, kot sta natrijev dodecil sulfat in urea (Galiazzo in sod., 1994; Fridovich, 1995). Pomembna je za obrambo pred superoksidnimi anioni, ki imajo eksogeni izvor ter tistimi anioni, ki iz mitohondrija difundirajo v intermembranski prostor (Furukawa in sod., 2004). Poleg tega so v študiji regulacije genske ekspresije antioksidativnih encimov v kvasovki *S. cerevisiae* tekom stacionarne faze ugotovili, da se pri stresu povzročenem z menadionom aktivnost mitohondrijske MnSOD v primerjavi s kontrolo zniža kar za polovico (Cyrne in sod., 2003). MnSOD je locirana v mitohondriju in zato bolj izpostavljena oksidativnemu stresu, ker ROS, ki nastanejo zaradi redoks kroženja menadiona povzročajo resne poškodbe mitohondrijskih encimov ter njihovo inaktivacijo (Cabiscol in sod., 2000). Poleg tega so s študijami dokazali, da je mitohondrijska SOD veliko bolj občutljiva na oksidativne poškodbe (Clerch in sod., 1998; MacMillan-Crow in sod., 1996).

Nespremenjena aktivnost superoksid dismutaze pri kulturi predtretirani s kvercetinom in naknadno izpostavljeni menadionu (Slika 27) je posledica reakcije kvercetina s superoksidnimi anioni, katerih nastanek sproži menadion. Ker je kvercetin učinkovit lovilce prostih radikalov-tudi superoksidnega aniona, v celicah ni potrebe po višji aktivnosti superoksid dismutaze. Nasprotno pa se je aktivnost superoksid dismutaze kulture, ki je bila predtretirana z askorbinsko kislino v primerjavi s kontrolo povečala za 24 % po 4 urah predtretiranja ter za 27 % po 24 urah predtretiranja (Slika 27). Po izpostavitvi kulture menadionu je aktivnost SOD kulture, ki je bila 4 ure predtretirana z askorbinsko kislino višja, kot pri kulturi, ki predhodno ni bila tretirana. V primeru 24-urnega predtretiranja je aktivnost SOD pri obeh kulturah enaka. To lahko pojasnimo s prooksidativnim delovanjem askorbinske kisline. Pri kulturi, ki je bila 4 ure tretirana z askorbinsko kislino in nato izpostavljena menadionu je nastalo več superoksidnega aniona kot pri kulturi, ki ni bila predtretirana, in sicer zaradi prooksidativnega delovanja. V primeru 24-urnega predtretiranja superoksidni anion najverjetneje nastaja samo zaradi redoks kroženja menadiona, zaradi česar je aktivnost superoksid dismutaze pri obeh kulturah enaka. Askorbinska kislina je namreč zelo nestabilna in v primerjavi z ostalimi antioksidanti v odzivu na oksidante brez težav razpade (Farahmand in sod., 2006; Choi in

sod., 2009). Po 24 urah od dodatka askorbinske kisline je torej povečana aktivnost superoksid dismutaze najverjetneje posledica indukcije stresnih odgovorov.

Učinki predtretiranja z askorbinsko kislino so zelo različni. V miškah, katere so bile izpostavljene γ radiaciji je predhodno uživanje askorbinske kisline močno povišalo aktivnost superoksid dismutaze v celicah kože (Chandra Jagetia in sod., 2003). V limfocitih, ki so jih izolirali iz krvi oseb, ki so uživale askorbinsko kislino so ugotovili, da askorbinska kislina poviša aktivnost superoksid dismutaze ter ublaži odziv limfocitov na oksidativni stres (Khassaf in sod., 2003).



Slika 27: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost superoksid dismutaze kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih specifičnih aktivnosti $\pm$ sd vsaj treh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

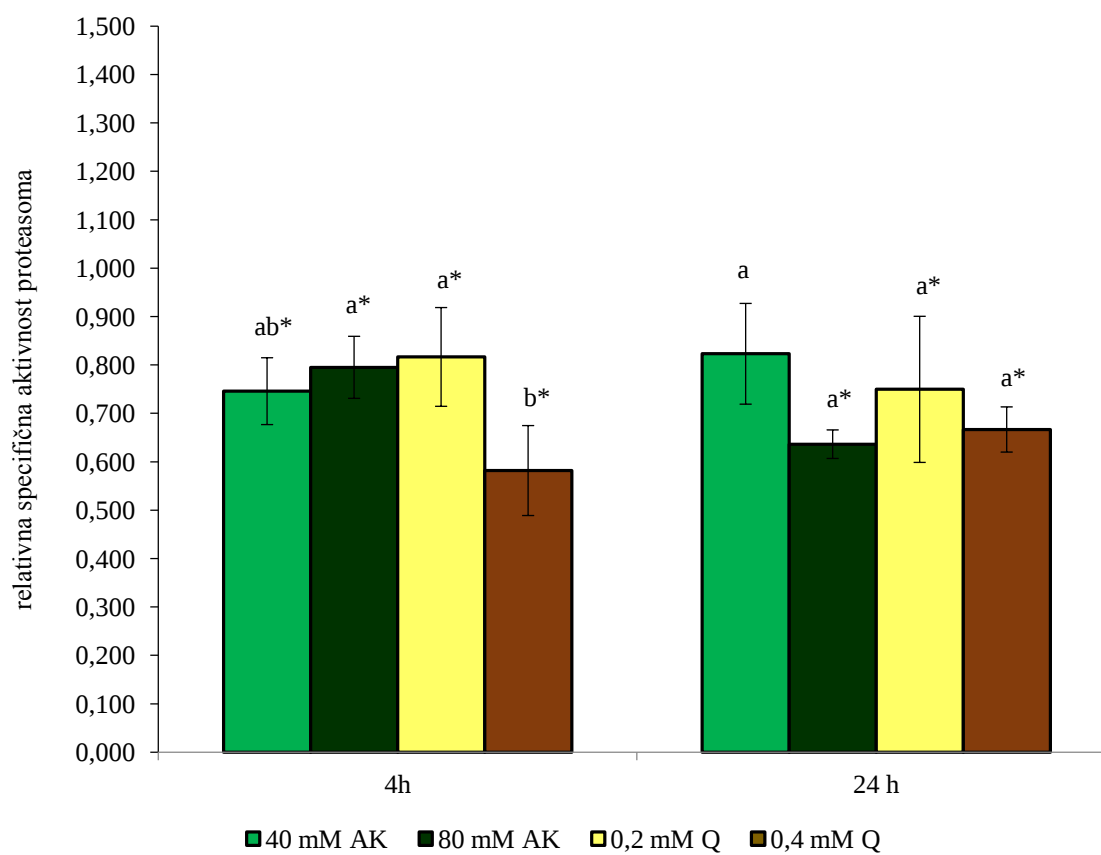
Figure 27: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) pretreatment for 4 and 24 hours and subsequent application of stress inductor-menadione (M) on yeast *S. cerevisiae* superoxide dismutase activity. Results are expressed as mean relative specific activities $\pm$ sd from at least three independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,05$.

4.2.5 Aktivnost proteasoma

Oksidativne poškodbe proteinov nastanejo, ko raven oksidantov naraste in primarni antioksidativni obrambni sistemi niso več dovolj učinkoviti. Ko v celicah nastanejo poškodbe, prevzamejo vlogo sekundarni antioksidativni obrambni sistemi. Proteinov, ki so ireverzibilno poškodovani zaradi nastanka metionin sulfonov, cistein sulfonične in sulfonične kisline ter karbonilov, celice ne morejo popraviti, zato je nujna njihova razgradnja s celičnimi proteolitičnimi sistemi (Petropoulos in Friguet, 2005).

Za razgradnjo poškodovanih, mutiranih ali napačno zviti proteinov skrbijo multikatalitični proteazni kompleksi imenovani proteasomi. 26S proteasomi so od ATP odvisni proteolitični kompleksi, ki jih sestavljajo 20S proteolitična jedra ter en ali dva 19S regulatorna kompleksa (Baumeister in sod., 1998; Coux in sod., 1996; Voges in sod., 1999). 20S jedro obstaja tudi kot samostojna enota, imenovana 20S proteasom, ki je veliko bolj stabilen in ga je lažje izolirati kot 26S proteasom. V nasprotju z 26S proteasomi 20S proteasom prepozna in razgradi oksidirane in nepravilno zvite proteine neodvisno od ATP in ubikvitinilacije, zato je pomemben za hitro odstranitev poškodovanih proteinov, ki nastanejo med oksidativnim stresom (Shringarpure in sod., 2001; Jung in Grune 2008; Grune in sod., 2003; Poppek in Grune, 2006). Aktivnost proteasoma smo merili preko kimotripsinske aktivnosti 20S proteasoma z detekcijo fluorescentnega AMC. Specifični inhibitor proteasoma MG-132, ki inhibira proteolitično aktivnost proteasoma, nam je omogočal razlikovanje aktivnosti proteasoma od ostalih proteaznih aktivnosti, ki so bile prisotne v vzorcih.

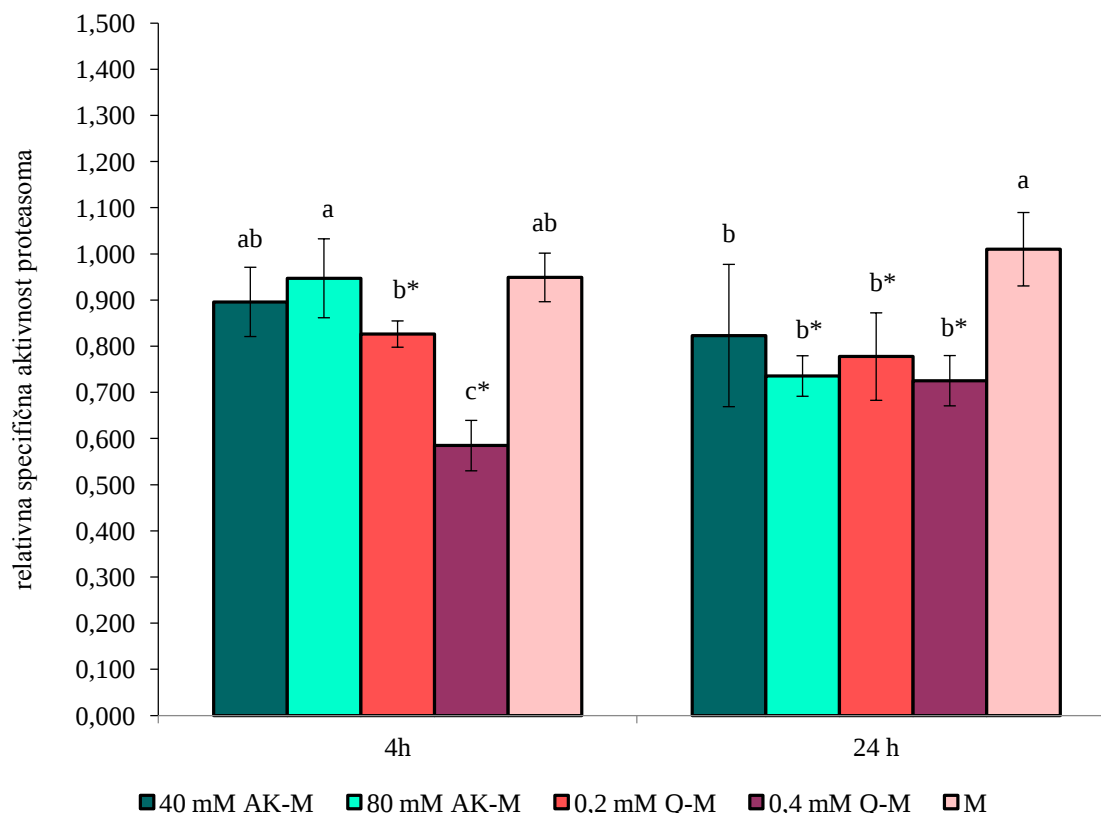
Iz naših rezultatov je razvidno, da je učinek 0,4 mM koncentracije kvercetina 4 ure po dodatku na znižanje aktivnosti proteasoma večji kot 0,2 mM koncentracije, medtem ko je znižanje 24 ur po dodatku enako pri obeh koncentracijah (Slika 28). Aktivnost proteasoma zniža tudi askorbinska kislina. Štiri ure po dodatku askorbinske kisline je učinek 40 mM oziroma 80 mM koncentracije enak, medtem ko je 24 ur po dodatku znižanje aktivnosti statistično značilno le pri 80 mM koncentraciji (Slika 28).



Slika 28: Vpliv kvercetina (Q) in askorbinske kisline (AK) na aktivnost proteasoma kvasovke *S. cerevisiae* 4 oz. 24 ur po dodatku. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih specifičnih aktivnosti $\pm$ sd vsaj dveh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,1$.

Figure 28: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) on yeast *S. cerevisiae* proteasome activity after 4 and 24 hours of supplementation. Results are expressed as mean relative specific activities $\pm$ sd from at least two independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,1$.

Aktivnost proteasoma se je znižala tudi pri kulturi, ki smo jo po predtretiranju s kvercetinom izpostavili induktorju stresa (Slika 29). Večje znižanje aktivnosti proteasoma je v primeru 4-urnega predtretiranja povzročila višja koncentracija kvercetina, medtem ko je znižanje aktivnosti po 24-urnem predtretiranju enako pri obeh koncentracijah kvercetina. V primeru predtretiranja z askorbinsko kislino se je aktivnost proteasoma po izpostavitvi kulture stresu znižala le po 24 urah predtretiranja z 80 mM askorbinsko kislino (Slika 29). Pri kulturi, ki smo jo po inkubaciji brez antioksidanta izpostavili menadionu pa sta aktivnosti 20S proteasoma enaki kot pri netretirani kulturi.



Slika 29: Vpliv 4 oz. 24-urnega predtretiranja s kvercetinom (Q) oziroma askorbinsko kislino (AK) ter naknadne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost proteasoma kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje relativnih specifičnih aktivnosti $\pm$ sd vsaj dveh neodvisnih eksperimentov. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b, c), se med seboj razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,1$.

Figure 29: Effect of quercetin (Q) and ascorbic acid (AK) pretreatment for 4 and 24 hours and subsequent application of stress inductor-menadione (M) on yeast *S. cerevisiae* proteasome activity. Results are expressed as mean relative specific activities $\pm$ sd from at least two independent measurements. Mean relative values marked with different index (a, b, c) at the same time are statistical different between each other. Values marked with asterisk (*) are statistically significantly different from control at $p \leq 0,1$.

Znižanje aktivnosti proteasoma v prisotnosti askorbinske kisline je najverjetneje posledica prooksidativnega delovanja askorbinske kisline. V raziskavi, v kateri so spremljali peptidazne aktivnosti 20S proteasoma v FAO celicah hepatoma po indukciji stresa z askorbinsko kislino v kombinaciji z železovimi ioni so namreč ugotovili, da se inaktivirajo vse tri peptidazne aktivnosti proteasoma (Conconi in sod., 1998).

Znižanje aktivnosti 20S proteasoma v prisotnosti kvercetina je posledica inhibicije aktivnosti 20S proteasoma. Dokazali so, da kvercetin učinkovito inhibira 20S proteasomsko aktivnost tako *in vitro* kot *in vivo*. Učinek inhibicije je odvisen od njegove koncentracije. Od vseh treh proteasomskih aktivnosti najbolj učinkovito inhibira ravno

kimotripsinsko (Chen in sod., 2005a; Dosenko in sod., 2007). Na podlagi *in silico* analiz predvidevajo, da se karbonilni ogljik kvercetina veže na β -5 podenoto, ki ima kimotripsinsko aktivnost, in sicer v taki orientaciji in konformaciji, da je dovzeten za nukleofilni napad N-terminalnega treonina β -5 podenote (Chen in sod., 2005a). Tudi iz naših rezultatov je razvidno, da kvercetin inhibira aktivnost proteasomov ter, da je stopnja inhibicije odvisna od koncentracije. V našem primeru štiri ure po dodatku kvercetina višja koncentracija povzroči višjo stopnjo inhibicije. Štiriindvajset ur po dodatku kvercetina pa je inhibitorni učinek pri obeh koncentracijah kvercetina enak. To bi bilo lahko posledica *de novo* sinteze 20S proteasomov ali ponovnega sestavljanja proteinov proteasoma. V stacionarni fazi rasti, ko so celice podvržene stresu staranja, prihaja do sprememb v ekspresiji genov, ki nosijo zapis za podenote proteasoma, v sestavi proteasomov ter njihovi funkciji. Povišana aktivnost 20S proteasomov tekom stresa med staranjem celic je torej lahko posledica spremenjene sestave proteasomov ali *de novo* sinteze (Chen in sod., 2004). Vendar pa dokazov, za takšno povišanje 20S proteasomske aktivnosti ob indukciji stresa v stacionarni fazi rasti ni.

Naši rezultati kažejo tudi, da stres povzročen z menadionom ni vplival na aktivnost 20S proteasomov. Nespremenjeno kimotripsinsko aktivnosti 20S proteasomov so dokazali tudi embrijih smrkeža po stresu povzročenem z menadionom ter v K562 celicah izpostavljenim H_2O_2 (Sharova in sod., 2007; Reinheckel in sod., 2000). Razlog, da kljub povzročenemu stresu ni prišlo do znižanja proteasomske aktivnosti, je v strukturi 20S proteasomov, ki so v primerjavi z 26S proteasomi mnogo bolj odporni na oksidativni stres in so zato zelo pomembni pri odstranjevanju oksidativno poškodovanih proteinov (Reinheckel in sod., 1998). Prav tako pa se proteasomska aktivnost kljub povečanemu stresu in posledično povečanemu številu oksidativnih poškodb proteinov ni povečala, ker imajo kvasovke poleg proteasomov tudi proteaze. Proteoliza v vakuolah namreč pomembno prispeva k razgradnji oksidativno poškodovanih proteinov (Marques in sod., 2006). Da se v času oksidativnega stresa v stacionarni fazi kvasovk poveča hitrost proteolize so s pomočjo uporabe inhibitorja serinskih proteaz dokazali tudi po indukciji stresa z menadionom (Cyrne in sod., 2003).

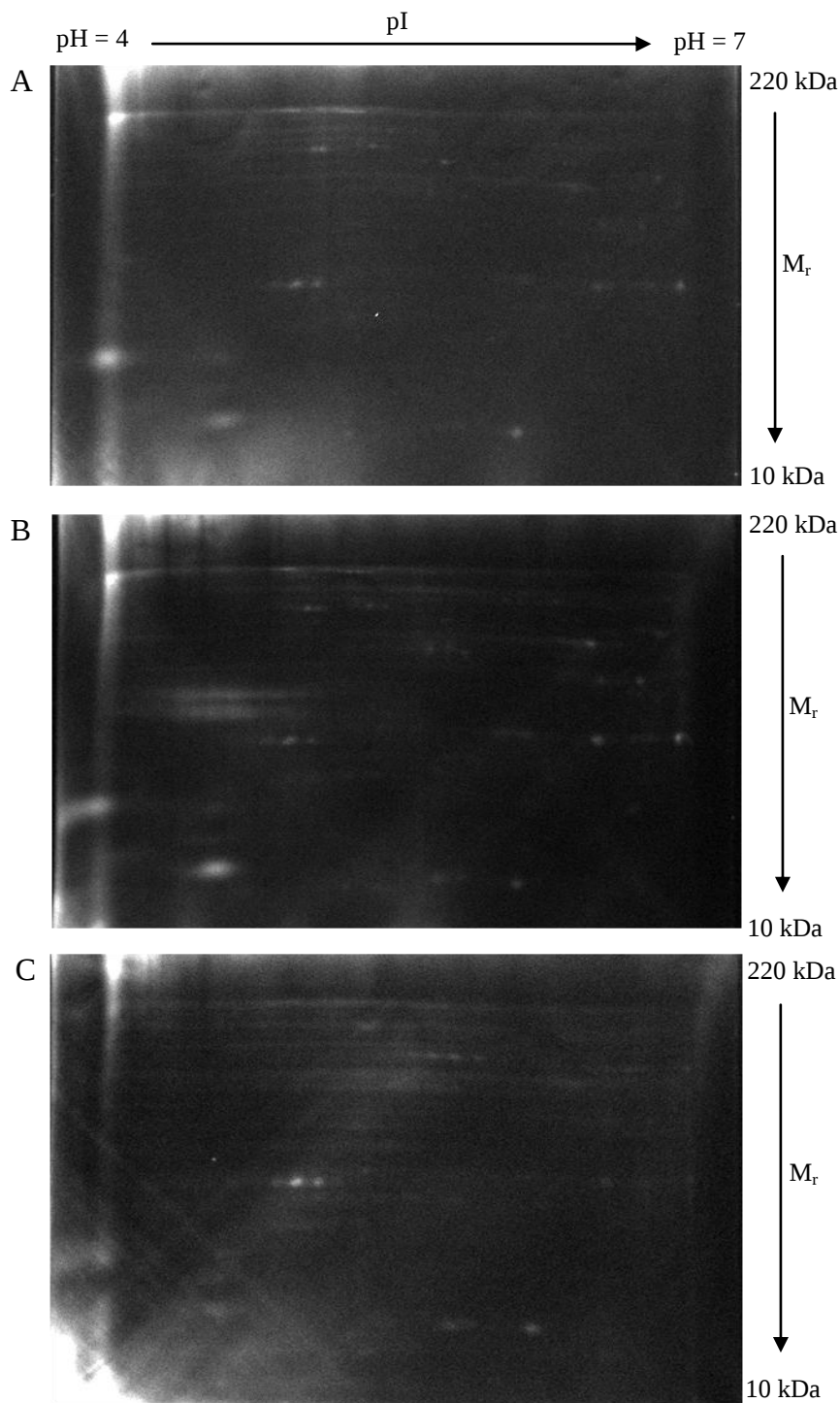
4.2.6 Analiza proteoma

Ker smo želeli dobiti celosten pogled na dogajanje v celicah po tretiranju z antioksidanti in/ali menadionom smo pogledali, kaj se dogaja v celicah na ravni proteoma. Proteini so namreč ključne molekule, ki so v celicah odgovorne za izvajanje fizioloških in patoloških funkcij. Proteinski profil v celicah je dinamičen in se neprestano spreminja v odvisnosti od fiziološkega in patološkega stanja sistema (Križaj, 2008).

4.2.6.1 Oksidativne poškodbe proteinov

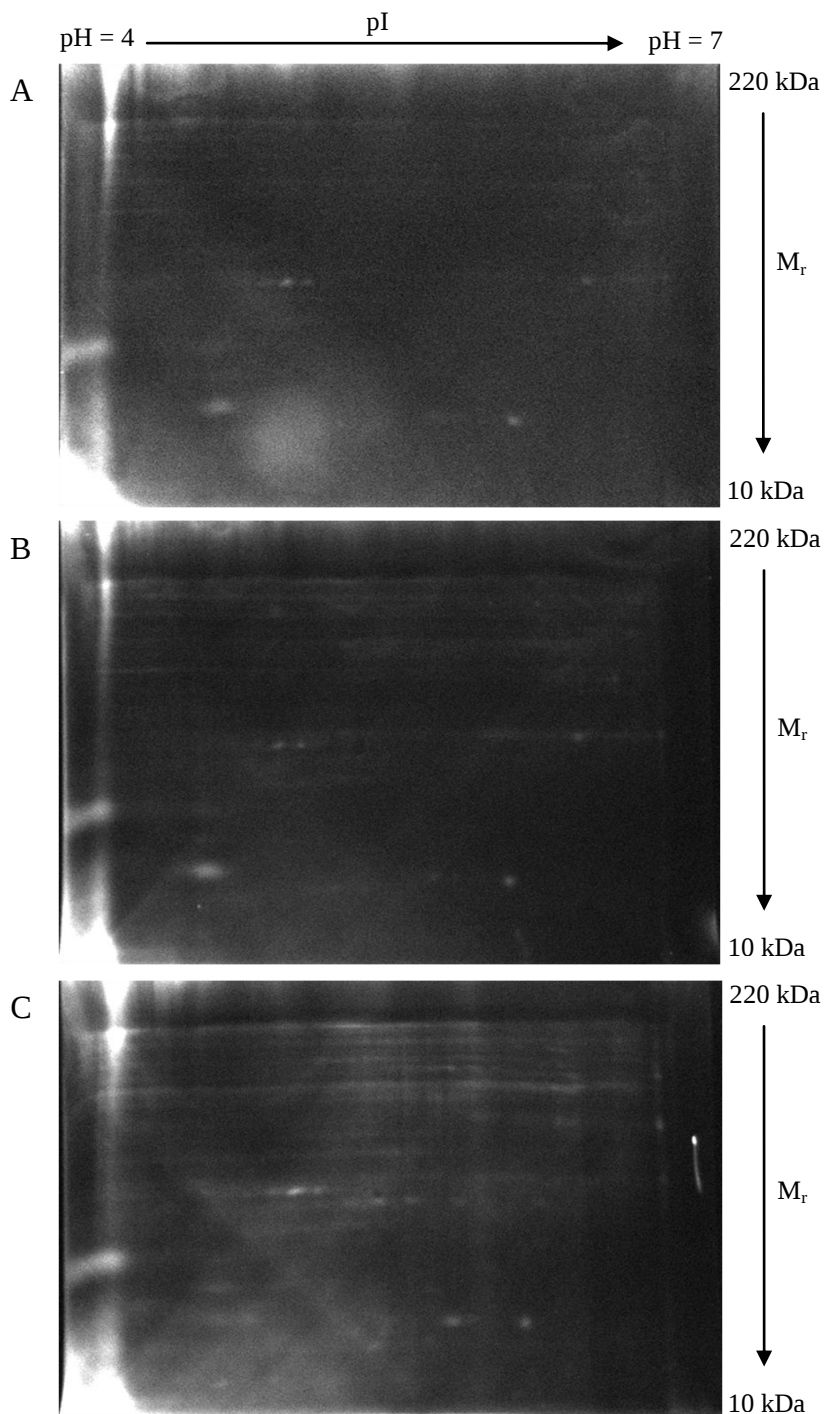
Ker so karbonili glavni produkt v oksidacijskih reakcijah posredovanih z ROS in ker nastajajo v različnih oksidativnih procesih, se uporabljajo za oceno oksidativnih poškodb proteinov (Stadtman in Levine, 2000). Oksidativne poškodbe proteinov oziroma karbonile smo določali v mitohondrijski frakciji s pomočjo dvodimenzionalne poliakrilamidne gelske elektroforeze. Za detekcijo oksidativno poškodovanih proteinov v gelu smo uporabili barvilo Alexa Fluor® 488 hydroxylamine (Invitrogen). Barvilo je zelen fluorescentni hidroksilamin, ki z aldehydi in ketoni tvori oksime (Life Technologies Corporation, 2012a).

Raven oksidativnih poškodb v kulturi, ki smo jo predhodno 4 ali 24 ur tretirali s kvercetinom oziroma askorbinsko kislino ter nato izpostavili menadionu, se v primerjavi s kulturo, ki predhodno ni bila tretirana, poveča (Sliki 30 in 31). Večja raven karbonilov bi lahko bila posledica inhibicije aktivnosti proteasoma. Dokazali smo namreč, da se tako v prisotnosti kvercetina kot tudi askorbinske kisline aktivnost proteasoma zniža. Iz rezultatov lahko zaključimo, da je vpliv antioksidantov na vsebnost karbonilov odvisen od koncentracije antioksidanta ter časa delovanja. Vse te poškodbe, tako v prisotnosti kot odsotnosti induktorja stresa, so najverjetneje prehodne narave, saj se povečana raven oksidativnih poškodb ne odraža v zmanjšani kultivabilnosti kulture. Poudariti moramo, da odziv celic na eksogene antioksidante in stres na celični ravni časovno ne sovпада z odzivom, ki je opazen na nivoju proteinov. Da koncentracija askorbinske kisline vpliva na vsebnost karbonilov so dokazali tudi, ko so preverjali ali askorbinska kislina prepreči oksidativne poškodbe proteinov v zamrznjeni plazmi izpostavljeni gama radiaciji. Ugotovili so, da 25 mM koncentracija askorbinske kisline učinkovito prepreči oksidacijo proteinov, medtem ko 50 mM koncentracija že kaže znake prooksidativnega delovanja (Zbikowska in sod., 2006). Podobno so ugotovili tudi za kvercetin, ko so preučevali ali prepreči nastanek karbonilov v eritrocitih, ki so izpostavljeni oksidativnem stresu. Ugotovili so namreč, da je nastanek karbonilov odvisen od koncentracije kvercetina ter od časa tretiranja. Z višanjem koncentracije kvercetina (0,1-100 μ M) se je količina karbonilov zmanjševala. Opazno znižanje količine karbonilov so opazili že po 15 min inkubacije s kvercetinom. Količina karbonilov se je zmanjševala vse do 120 min, po daljših časih tretiranja pa je začela količina karbonilov rahlo naraščati (Pandey in Rizvi, 2010).



Slika 30: Reprezentativni 2-D profili karbonilov kulture kvasovke *S. cerevisiae*. Profil karbonilov kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti (A) oziroma je bila predhodno tretirana 4 ure s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).

Figure 30: Representative 2-D carbonyl profiles of *S. cerevisiae* culture. (A) Carbonyl profile of culture not treated with antioxidants before the exposure to menadione and pretreated with quercetin (B) or ascorbic acid (C) for 4 hours.



Slika 31: Reprezentativni 2-D profili karbonilov kulture kvasovke *S. cerevisiae*. Profil karbonilov kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti (A) oziroma je bila predhodno tretirana 24 ur s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).

Figure 31: Representative 2-D carbonyl profiles of *S. cerevisiae* culture. (A) Carbonyl profile of culture not treated with antioxidants before the exposure to menadione and pretreated with quercetin (B) or ascorbic acid (C) for 24 hours.

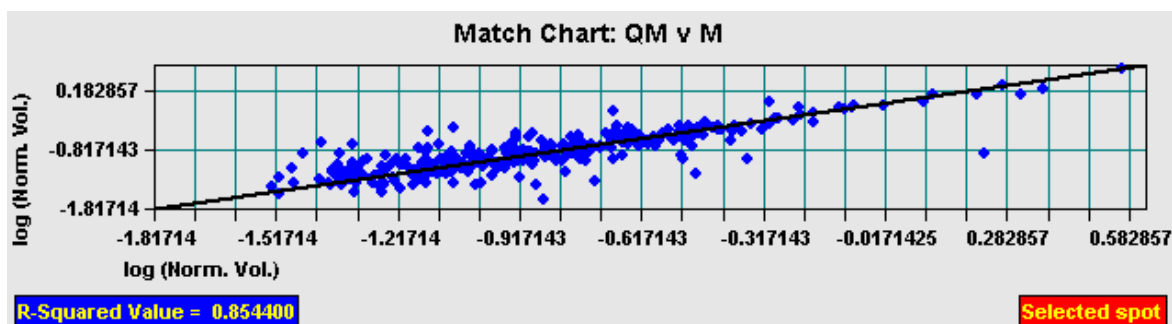
4.2.6.2 Proteinski profil kulture

Preučevanje proteinskih profilov nam omogoča preučevanje sprememb v ravni proteinov.

Vpliv tretiranja z antioksidanti in/ali menadionom je prikazan na grafih, ki prikazujejo korelacijo proteinskih profilov predhodno tretirane kulture (z askorbinsko kislino oz. s kvercetinom) ter kulture, ki ni bila predtretirana z antioksidantom. Podobnost proteinskih profilov obeh kultur je podana s korelacijskim faktorjem (R^2). Najvišja vrednost korelacijskega faktorja je 1. Bližje kot je vrednost korelacijskega faktorja vrednosti 1, bolj sta si proteinska profila podobna. Podobnost profilov lahko vidimo tudi kot zgoščenost točk (pik), ki predstavljajo proteinske lise, na linearni premici. Nižja kot je vrednost korelacijskega faktorja, manj sta si proteinska profila podobna in večja je razpršenost točk (pik) na grafu.

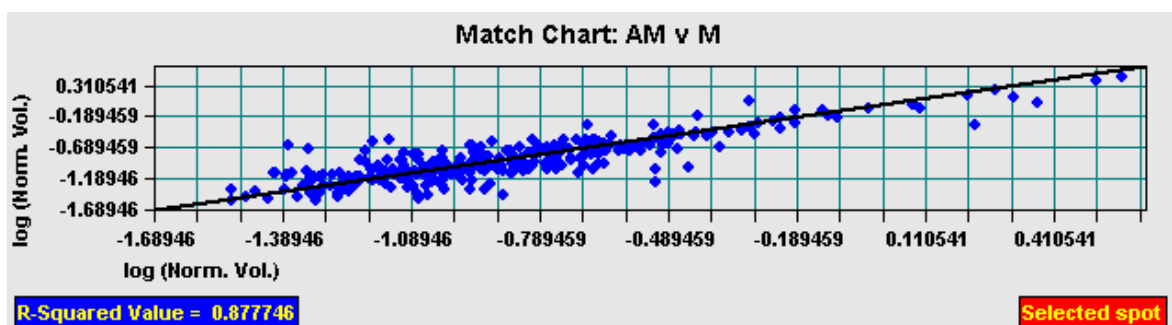
Naši rezultati kažejo, da sta proteinska profila kulture, ki je bila 4 ure predtretirana z antioksidantom in kulture, ki ni bila predtretirana praktično enaka (Sliki 32 in 33). Ne kvercetin ne askorbinska kislina torej nista povzročila večjih sprememb v proteomu. Razlog, da sprememb nismo zaznali najverjetneje ni v tem, da do njih ni prišlo, temveč v tem, da vpliva antioksidantov in menadiona z omenjeno metodo še ni bilo mogoče detektirati na ravni proteoma. V primeru 24-urnega predtretiranja je askorbinska kislina veliko bolj vplivala na profil proteinov kot kvercetin (Sliki 34 in 35). Vpliv kvercetina je tako v primeru 4-urnega kot tudi 24-urnega predtretiranja enak, medtem, ko se je vpliv askorbinske kisline po 24 urah predtretiranja večji kot po 4 urah.

Podobnost v proteinskih profilih kulture predtretirane s kvercetinom in kulture, ki predhodno ni bila tretirana si lahko razlagamo kot povečanje proteinskega obrata. Korelacija v proteinskih profilih kulture predtretirane z askorbinsko kislino in kulture, ki ni bila predtretirana kaže, da je nivo proteinov kulture, ki je bila 24 ur predtretirana, višji. To bi lahko bila posledica indukcije obrambnih mehanizmov oz. težnje celic po vzdrževanju redoks ravnotežja.



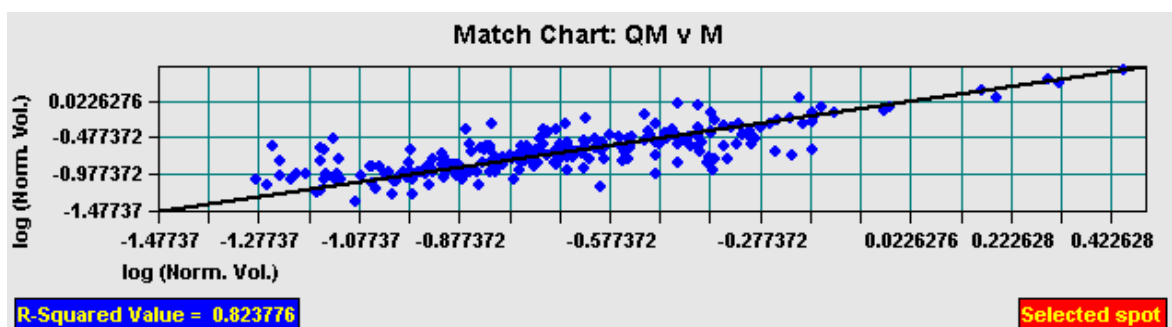
Slika 32: Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke *S. cerevisiae*, ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 4 ure predtretirana s kvercetinom.

Figure 32: Protein profiles correlation of yeast *S. cerevisiae* culture not pretreated with antioxidants before menadione supplementation and culture pretreated with quercetin for 4 hours.



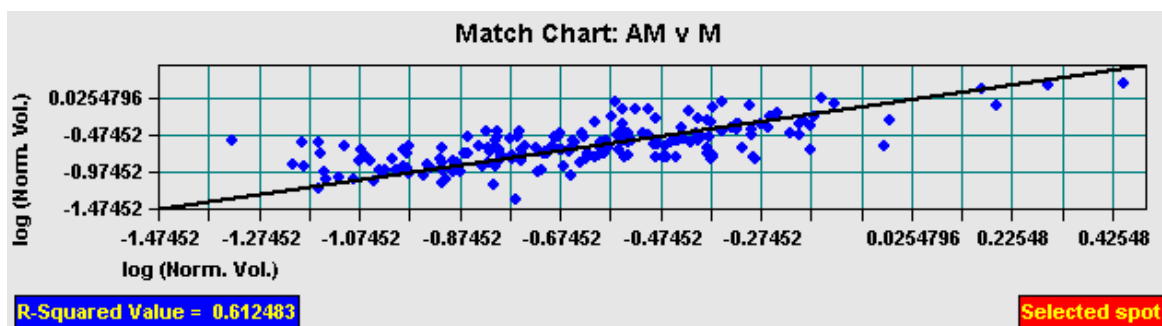
Slika 33: Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke *S. cerevisiae*, ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 4 ure predtretirana z askorbinsko kislino.

Figure 33: Protein profiles correlation of yeast *S. cerevisiae* culture not pretreated with antioxidants before menadione supplementation and culture pretreated with ascorbic acid for 4 hours.



Slika 34: Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke *S. cerevisiae*, ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 24 ur predtretirana s kvercetinom.

Figure 34: Protein profiles correlation of yeast *S. cerevisiae* culture not pretreated with antioxidants before menadione supplementation and culture pretreated with quercetin for 24 hours.



Slika 35: Korelacija proteinskih profilov kulture kvasovke *S. cerevisiae*, ki pred dodatkom menadiona ni bila predtretirana z antioksidanti in kulture, ki je bila 24 ur predtretirana z askorbinsko kislino.

Figure 35: Protein profiles correlation of yeast *S. cerevisiae* culture not pretreated with antioxidants before menadione supplementation and culture pretreated with ascorbic acid for 24 hours.

4.3 ZAKLJUČNA DISKUSIJA S HIPOTEZAMI

Danes je vse več pozornosti namenjene preučevanju vloge ter ugodnih učinkov antioksidantov pri zdravljenju različnih zdravstvenih motenj in bolezni, ki so posledica delovanja oksidativnega stresa. Veliko raziskav na antioksidantih je narejenih z *in vitro* metodami, ki so uporabne za oceno sposobnosti lovljenja prostih radikalov. Vendar s temi metodami ni možno pridobiti informacij o karakteristikah antioksidantov in največkrat tudi ne o njihovem potencialu preprečevanja oksidacije. Zato smo v okviru doktorske disertacije preučili vpliv eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne sisteme *in vivo*, saj je razumevanje in poznavanje osnovnih mehanizmov delovanja osnova za nadaljnje študije.

Ker so mikroorganizmi primeren model za preučevanje različnih vidikov oksidativnega stresa na biokemijski, molekularno biološki in celični ravni (Sigler in sod., 1999) in ker smo želeli dobiti čim bolj relevanten model, smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo v stacionarni fazi rasti iz gojišča prenesli v pufer PBS ter jo inkubirali 96 ur. Kvasovka *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti, inkubirana v pufru določen čas, je dober modelni mikroorganizem za evkariontske celice, zaradi ohranjenosti antioksidativnih obrambnih sistemov, respiratornega metabolizma ter G₀ faze rasti, v kateri je tudi večji del človeških celic večino časa (Yanagida, 2009; Longo in sod., 1996). Kvasovke imajo v primerjavi s celičnimi linijami mnoge tehnične prednosti: za rast potrebujejo definirano, enostavno in poceni gojišče, njihovo vzdrževanje je enostavno in poceni ter imajo kratek podvojevalni čas. Na prvi pogled se kvasovka mogoče ne zdi dovolj reprezentativna kompleksnosti človeka, vendar je dovolj zgovoren podatek, da ima 40 % proteinov kvasovk aminokislinska zaporedja, ki so slična vsaj enemu proteinu človeka. Poleg tega ima 30 % človeških proteinov, ki so vpleteni v nastanek bolezni ortologne gene v kvasovkah.

Ob začetku raziskave smo postavili več hipotez o vplivu eksogenih antioksidantov na endogeni antioksidativni obrambni sistem. Hipotezo 1, da tretiranje celic z antioksidanti, ki delujejo direktno kot lovilci radikalov, povzroči zmanjšanje ekspresije in/ali aktivnosti endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov in tako poveča občutljivost celic na induciran oksidativni stres, smo ovrgli. Ovrgli smo jo tako v primeru delovanja askorbinske kisline kot tudi kvercetina. Predtretiranje kulture z askorbinsko kislino je v primerjavi s kulturo, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila predtretirana povzročilo le zmanjšanje aktivnosti proteasoma v primeru 24-urnega predtretiranja, medtem ko sta se v odvisnosti od časa predtretiranja vsebnost reducirane oblike glutathiona in aktivnost superoksid dismutaze povečali oziroma sta ostali nespremenjeni. Znižanje proteasomske aktivnosti ni povečalo občutljivosti celic na induktor oksidativnega stresa, saj je bila kultivabilnost predtretirane kulture enaka kultivabilnosti kulture, ki predhodno ni bila tretirana z askorbinsko kislino. Predtretiranje kulture s kvercetinom je v primerjavi s

kulturo, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila predtretirana, povzročilo znižanje aktivnosti proteasoma ter superoksid dismutaze (le v primeru 24-urnega predtretiranja). Kljub znižanju aktivnosti, se občutljivost celic na induktor oksidativnega stresa ni povečala, saj je bila kultivabilnost predtretirane kulture višja od kultivabilnosti kulture, ki predhodno ni bila tretirana s kvercetinom.

Hipotezo 2, da tretiranje celic z antioksidanti, ki delujejo indirektno z indukcijo endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov zmanjša občutljivost celic na induciran oksidativni stres smo delno potrdili v primeru kvercetina. Predtretiranje kulture s kvercetinom, ki deluje indirektno z zvišanjem produkcije glutationa, je v primerjavi s kulturo, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila predtretirana, povzročilo povečanje kultivabilnosti, torej je zmanjšalo občutljivost celic na induciran oksidativni stres.

Prav tako smo potrdili hipotezo 3, da je antioksidativni učinek v celici-direktni ali indirektni, povezan s časom izpostavitve celic antioksidantu. Učinek askorbinske kisline in kvercetina na endogene antioksidativne obrambne sisteme ni enak v primeru 4-urnega in 24-urnega predtretiranja.

Potrdili smo tudi hipotezo 4, da je vpliv hidrofilnega antioksidanta na endogene antioksidativne obrambne sisteme drugačen, kot vpliv lipofilnega antioksidanta. Vpliv askorbinske kisline, ki je hidrofilni antioksidant in kvercetina, ki ima lipofilen značaj, je na endogene antioksidativne obrambne sisteme ob enakih časih tretiranja različen.

Z opravljeno raziskavo smo dobili vpogled v delovanje endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov ter preučili vpliv eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne obrambne sisteme tako v odsotnosti, kot prisotnosti induktorja stresa. Iz rezultatov je razvidno, da je vpliv eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne sisteme kompleksen in težko govorimo samo o direktnem oziroma samo indirektnem delovanju posameznega antioksidanta. Eksogeni antioksidanti so pravzaprav za celice nekakšna obremenitev, in sicer v smislu prilagoditve delovanja endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov dodanim antioksidantom z namenom vzdrževanja redoks homeostaze. Dokazali smo, da je delovanje eksogenih antioksidantov odvisno od časa izpostavitve antioksidantu, prisotnosti oz. odsotnosti induktorja stresa ter fizikalno kemijskih lastnosti antioksidanta. Zaradi naštetih ter mnogih drugih parametrov (kot npr. koncentracija antioksidanta), ki vplivajo na odziv endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov so rezultati določene študije specifični za uporabljene antioksidante in jih ni mogoče posplošiti na druge.

Rezultatov naših raziskav ne moremo direktno ekstrapolirati na ljudi, so pa za razumevanje osnovnih mehanizmov delovanja eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne obrambne sisteme pomembni. Na aktivnost antioksidantov pri ljudeh vpliva njihova biološka razpoložljivost. Antioksidanti se namreč absorbirajo, transportirajo, razporedijo ter zadržujejo v bioloških tekočinah, celicah in tkivih. To pa pri preučevanju osnovnih

mehanizmov delovanja predstavlja še mnogo dodatnih parametrov, ki jih je potrebno upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Vendar pa je vpliv antioksidantov na endogene antioksidativne obrambne sisteme odvisen tudi od samih endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov. Le te pa imamo ljudje zaradi načina življenja ter vpliva v različnih stanjih. Zato je *S. cerevisiae* za preučevanje osnovnih mehanizmov delovanja mnogo bolj primerna, saj lahko s prilagajanjem parametrov uspešno kontroliramo njeno rast in razmnoževanje ter si tako za preučevanje zagotovimo modelni organizem, ki je vedno v enakem fiziološkem stanju.

Menimo, da so dobljeni rezultati osvetlili delovanje askorbinske kisline in kvercetina v celici ter njuno vlogo v zaščiti pred povečano produkcijo ROS kot posledica izpostavitve induktorju oksidativnega stresa. Hkrati so pridobljene informacije pomembne tudi za razvoj prehranskih, kozmetičnih in farmacevtskih pripravkov, ki se množično pojavljajo na tržišču kot antioksidanti.

4.4 SKLEPI

- Kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, kultivirana v gojišču do stacionarne faze, prenesena v PBS in inkubirana 96 do 192 ur (plato 1) je primeren evkariontski model za preučevanje vpliva različnih okoljskih stresnih dejavnikov.
- Tretiranje kulture z askorbinsko kislino (4 h in 24 h) se je v primerjavi s kulturo, ki ni bila tretirana pokazalo v nespremenjeni (4 h) oz. manjši kultivabilnosti (24 h), nespremenjenem nivoju znotrajcelične oksidacije in količini razpoložljivega ATP, nespremenjeni (4 h) oz. znižani (24 h) vsebnosti reducirane oblike glutationa, višji aktivnosti superoksid dismutaze ter znižani aktivnosti proteasoma.
- Tretiranje kulture s kvercetinom (4 h in 24 h) se je v primerjavi s kulturo, ki ni bila tretirana pokazalo v manjši (4 h) oz. večji (24 h) kultivabilnosti, nižjem nivoju znotrajcelične oksidacije, nespremenjeni (4 h) oz. višji (24 h) količini razpoložljivega ATP in vsebnosti reducirane količine glutationa, višji aktivnosti superoksid dismutaze ter znižani aktivnosti proteasoma.
- Predtretiranje kulture z askorbinsko kislino (4 in 24 h) in naknadna izpostavitvev menadionu kot induktorju oksidativnega stresa se je v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, pokazalo v nespremenjeni kultivabilnosti in nivoju znotrajcelične oksidacije, zmanjšani količini razpoložljivega ATP, višji (4 h) oz. nespremenjeni (24 h) vsebnosti reducirane oblike glutationa, višji (4 h) oz. nespremenjeni (24 h) aktivnosti superoksid dismutaze, nespremenjeni (4 h) oz. znižani (24 h) aktivnosti proteasoma ter večji vsebnosti oksidativnih poškodb proteinov.
- Predtretiranje kulture s kvercetinom (4 h in 24 h) in naknadna izpostavitvev menadionu kot induktorju oksidativnega stresa se je v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, pokazalo v večji kultivabilnosti, nižjem nivoju znotrajcelične oksidacije, nespremenjeni (4 h) oz. višji (24 h) količini razpoložljivega ATP, višji vsebnosti reducirane oblike glutationa, nespremenjeni (4 h) oz. znižani (24 h) aktivnosti superoksid dismutaze, znižani aktivnosti proteasoma in večji vsebnosti oksidativnih poškodb proteinov.
- Predtretiranje kulture 4 ure s kvercetinom ali askorbinsko kislino ter naknadna izpostavitvev menadionu kot induktorju stresa v primerjavi s kontrolo ni povzročilo sprememb v proteinskem profilu kvasovke *S. cerevisiae*. V primeru 24-urnega predtretiranja je bila sprememba v proteinskem profilu pri askorbinski kislini večja kot pri kvercetinu.

- Predtretiranje s kvercetinom se je v primerjavi z askorbinsko kislino izkazalo za bolj učinkovito v zaščiti celic pred induktorjem oksidativnega stresa.
- Štiriindvajset-urno predtretiranje s kvercetinom je v zaščiti celic pred induktorjem stresa bolj učinkovito kot 4-urno. V primeru askorbinske kisline se je za bolj učinkovito izkazalo 4-urno predtretiranje.
- Delovanje eksogenih antioksidantov v celicah ni neodvisno, temveč se močno prepleta z delovanjem primarnih in sekundarnih endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov in je specifično za posamezen antioksidant.
- Kvercetin in askorbinska kislina lahko v celicah delujeta antioksidativno ali prooksidativno, kar je odvisno od koncentracije, časa delovanja in aktivnosti endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov.

5 POVZETEK (SUMMARY)

5.1 POVZETEK

Antioksidant je vsaka snov, ki že v nizki koncentraciji (v primerjavi s koncentracijo substrata, ki je tarča radikalov) opazno zadrži ali prepreči oksidacijo substrata. Celice imajo lastne endogene antioksidativne obrambne sisteme, ki jih delimo na primarne in sekundarne. Primarni obrambni sistemi preprečijo začetne in/ali propagacijske reakcije radikalov in oksidantov s celičnimi komponentami. Mednje sodijo encimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza,...) in neencimski (glutation, tioredoksin,...) obrambni sistemi. Sekundarni obrambni sistemi v celicah prevzamejo vlogo, ko primarni niso več zadostni ter nastanejo poškodbe. Poleg encimov pa celice sintetizirajo ali prevzamejo iz okolja tudi številne majhne antioksidativne molekule, ki začasno zadržijo ali preprečijo oksidacijo lipidov, DNA in proteinov. Tovrstne molekule so v središču mnogih raziskav zaradi ugodnih učinkov na zdravje ljudi. Molekule, ki delujejo antioksidativno in jih mikroorganizmi prevzamejo iz okolja ter ljudje zaužijejo s hrano imenujemo eksogeni antioksidanti. Za mnoge učinkovine je bilo z *in vitro* metodami dokazano, da so učinkoviti antioksidanti, učinkovitost le teh v celicah in organizmih lahko povsem drugačna.

Cilj naloge je bil preučiti vpliv eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne obrambne mehanizme kvasovke. V ta namen smo postavili tudi modelni organizem *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti. Kultivacija kvasovke je potekala 60 h v gojišču YEPD ter nato še 96 h v pufru PBS, v katerem je potekalo tudi tretiranje z antioksidanti in oksidanti. Celice smo najprej 4 oziroma 24 ur tretirali z askorbinsko kislino oziroma kvercetinom, sledila je izpostavitvev induktorju oksidativnega stresa. Vpliv smo preučevali tako na celičnem kot tudi molekularnem nivoju. Vpliv predtretiranja z antioksidanti kot tudi naknadno izpostavitvev induktorju oksidativnega stresa smo na celični ravni preverili z merjenjem znotrajcelične oksidacije, celične energijske metabolne aktivnosti in kultivabilnosti z določanjem števila kolonijskih enot. Na molekularni ravni smo se osredotočili na raven proteinov. Določili smo aktivnost nekaterih encimskih endogenih antioksidativnih sistemov (superoksid dismutaza, proteasom), vsebnost neencimskih endogenih sistemov (glutation), raven oksidativnih poškodb proteinov ter spremembo v proteinskem profilu.

Naši rezultati kažejo, da je predtretiranje s kvercetinom v primerjavi z askorbinsko kislino boljše v zaščiti celic pred induktorjem oksidativnega stresa. To se odraža v znižanem nivoju znotrajcelične oksidacije, višji vsebnosti reducirane oblike glutationa ter večji kultivabilnosti celic, ki kaže na zmanjšano občutljivost celic na induktor oksidativnega stresa. V nasprotju s kvercetinom, predtretiranje z askorbinsko kislino ni pripomoglo k večji kultivabilnosti ter znižanju znotrajcelične oksidacije, vsebnost reducirane oblike glutationa pa je bila višja le v primeru krajšega predtretiranja. V primeru askorbinske

kisline se je tako za bolj učinkovito izkazalo 4-urno predtretiranje, medtem ko je bilo 24-urno predtretiranje s kvercetinom bolj učinkovito kot 4-urno. Delovanje kvercetina in askorbinske kisline v celicah je lahko prooksidativno ali antioksidativno, kar je odvisno od koncentracije, časa delovanja in aktivnosti endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov. Eksogeni antioksidanti v celicah torej ne delujejo neodvisno, temveč je njihovo delovanje odvisno tudi od aktivnosti primarnih in sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov in je specifično za posamezen antioksidant.

5.2 SUMMARY

Antioxidant has been defined as any substance that, when present at low concentrations compared to those of an oxidizable substrate, significantly delays or prevents oxidation of that substrate. Cells possess endogenous antioxidative defense systems, which can be categorized into primary and secondary antioxidative defense systems. Primary antioxidative systems suppress initiation and/or break chain propagation free radical reactions with cell components. Cells possess enzymatic (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase,...) and nonenzymatic (glutathione, thioredoxin,...) primary antioxidative defense systems. When harmful free radicals are not neutralized by the primary antioxidative defense systems and damages appear, secondary antioxidative defense systems take role. Besides enzymes, cells also synthesize or uptake from the environment many small antioxidative molecules, which temporarily retain or prevent lipid, DNA and protein oxidation. These molecules are of great interests because of their health beneficial effects. Exogenous antioxidants are molecules with antioxidative properties that are up-taken from the environment by microorganisms or consumed with food by people. Many molecules exert their antioxidative properties *in vitro*, but their properties in cell and organisms may differ from those *in vitro*.

The aim of the study was to investigate the influence of exogenous antioxidants on endogenous antioxidative systems in yeast. In this purpose we also design a model organism *Saccharomyces cerevisiae* in stationary phase. Yeast cells were cultivated in YEPD medium for 60 h and then transferred in PBS buffer for 96 h. Culture in PBS buffer was treated with antioxidants and oxidants. Cells were treated with ascorbic acid or quercetin for 4 and 24 h and then exposed to inductor of oxidative stress. Influence of antioxidant pretreatment and subsequent application of stress inductor was analyzed at cellular level by measuring intracellular oxidation, cell energy metabolic activity and cultivability as colony forming units. At molecular level we focused on proteins. We determined the activity of some enzymatic endogenous antioxidative defense systems (superoxide dismutase, proteasome), level of nonenzymatic endogenous antioxidative defense systems (glutathione), level of carbonyls and changes in yeast protein profile.

Our results show that pretreatment with quercetin compared to pretreatment with ascorbic acid is much more protective against subsequent application of stress inductor. Higher cultivability, lower intracellular oxidation level and increased intracellular glutathione content in reduced form reflect reduced cell sensitivities to oxidative stress inductor. In contrast to quercetin, pretreatment with ascorbic acid did not increase cultivability and lower intracellular oxidation level. Additionally, intracellular glutathione content in reduced form was increased only in the case of short pretreatment. Pretreatment with ascorbic acid was more efficient in the case of 4-hours, whereas in the case of quercetin pretreatment was more efficient in the case of 24-hours compared to 4-hours pretreatment. In cells quercetin and ascorbic acid may have prooxidative or antioxidative effects, depending on concentration, time of exposure and activity of endogenous antioxidative defense systems. Exogenous antioxidants do not act independently. Their influence is dependent on primary and secondary antioxidative defence systems and is specific of type of antioxidant.

6 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32.
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski Vestnik, 48: 573-589.
- Afanas'ev I. B., Dorozhko A. I., Brodskii A. V., Kostyuk V. A., Potapovitch A. I. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology, 38, 11: 1763-1769.
- Akerboom T. P. M., Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods in Enzymology, 77: 373-382.
- Akterin S., Cowburn R. F., Miranda-Vizueté A., Jimenez A., Bogdanovic N., Winblad B., Cedazo-Minguez A. 2006. Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in β -amyloid toxicity and Alzheimer's disease. Cell Death and Differentiation, 13: 1454-1465.
- Alia M., Mateos R., Ramos S., Lecumberri E., Bravo L., Goya L. 2006. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). European Journal of Nutrition, 45: 19-28.
- Allen C., Büttner S., Aragon A. D., Thomas J. A., Meirelles O., Jaetao J. E., Benn D., Ruby S. W., Veenhuis M., Madeo F., Werner-Washburne M. 2006. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. Journal of Cell Biology, 174: 89-100.
- Ames B. N., Gold L. S., Willett W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 5258-5265.
- Anderson D. J., Guo B., Xu Y., Ng L. M., Kricka L. J., Skogerboe K. J., Hage D. S., Schoeff L., Wang J., Sokoll L. J., Chan D. W., Ward K. M., Davis K. A. 1997. Clinical chemistry. Analytical Chemistry, 69, 12: 165R-229R.
- André C. M., Larondelle Y., Evers D. 2010. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. Current Nutrition and Food Science, 6: 2-12.

- Areias F. M., Rego A. C., Oliveira C. R., Seabra R. M. 2001. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ $\text{Fe}^{(2+)}$ -induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochemical Pharmacology*, 62: 111-118.
- Arrigoni O., De Tullio M. C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569: 1-9.
- 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.
- Atlas R. M., Lawrence P. 1993. *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, CRC Press: 1006-1007.
- Awad H. M., Boersma M. G., Boeren S., van Bladeren P. J., Vervoort J., Rietjens I. M. 2002. The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chemical Research in Toxicology*, 15: 343-351.
- Bader N., Grune T. 2006. Protein oxidation and proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 387: 1351-1355.
- Bakker B. M., Overkamp K. M., van Maris A. J. A., Kötter P., Luttik M. A. H., van Dijken J. P., Pronk J. T. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 15-17.
- Barja G. 1999. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31: 347-366.
- Bartosz G. 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. *Biochemical Pharmacology*, 77: 1303-1315.
- Bast A., Haenen G. R. M. M. 2002. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11: 251-258.
- Batič M., Raspor P. 2000. Kvasna biomasa kot vir antioksidativnih snovi. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67-75.

- Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E. 1998. The proteasome. Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92: 367-380
- Belinha I., Amélia Amorim M., Rodrigues P., de Freitas V., Moradas-Ferreira P., Mateus N., Costa V. 2007. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2446-2451.
- Benaroudj N., Lee D. H., Goldberg A. L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 24261-24267.
- Bender T., Leidhold C., Ruppert T., Franken S., Voos W. 2010. The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics*, 10: 1426-1443.
- Berggren K., Chernokalskaya E., Steinberg T. H., Kemper C., Lopez M. F., Diwu Z., Haugland R. P., Patton W. F. 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis*, 21: 2509-2521.
- Berggren K., Steinberg T. H., Lauber W. M., Carroll J. A., Lopez M. F., Chernokalskaya E., Zieske L., Diwu Z., Haugland R. P., Patton W. F. 1999. A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports. *Analytical Biochemistry*, 276: 129-143.
- Berlett B. S., Stadtman E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 20313-20316.
- Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science*, 89: 1113-1121.
- Biehler E., Bohn T. 2010. Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability. *Current Nutrition and Food Science*, 6: 44-69.
- Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 994-1003.
- Bilinski T., Litwinska J., Blaszczynski M., Bajusz A. 1989. Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of autooxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1001: 102-106.

- Biovision. 2011a. Superoxide dismutase (SOD) activity assay kit. Mountain View, Biovision Research Products: 2 str.
- Biovision. 2011b. Proteasome activity assay kit. Mountain View, Biovision Research Products: 2 str.
- Biovision. 2011c. Glutathione assay kit (GSH, GSSG and total). Mountain View, Biovision Research Products: 1 str.
- Bodannes R. S., Chan P. C. 1979. Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Letters*, 105: 195-196.
- Boer J., Hoeijmakers J. H. 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21: 453-460.
- Bonini M. G., Rota C., Tomasi A., Mason R. P. 2006. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy?. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 6: 968-675.
- Boots A. W., Balk J. M., Bast A., Haenen G. R. 2005. The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spreads oxidized quercetin-induced toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 923-929.
- Boots A. W., Haenen G. R. M. M., Bast A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585: 325-337.
- Boots A. W., Haenen G. R. M. M., den Hartog G. J., Bast A. 2002. Oxidative damage shifts from lipid peroxidation to thiol arylation by catechol-containing antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1583: 279-284.
- Boots A. W., Kubben N., Haenen G. R. M. M., Bast A. 2003. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308: 560-565.
- Boots A. W., Li H., Schins R. P., Duffin R., Heemskerk J. W., Bast A., Haenen G. R. 2007. The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, 1: 89-96.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. 1990. Radical chemistry of flavonoid antioxidants. V: Antioxidants in therapy and preventive medicine. Emerit I., Packer L. Auclair C. (eds.). New York, Plenum Press: 165-170.

- Bors W., Michel C., Saran M. 1994. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods in Enzymology*, 234: 420-429.
- Boschi-Muller S., Gand A., Branlant G. 2008. The methionine sulfoxide reductases: catalysis and substrate specificities. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474: 266-273.
- Bouayed J., Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiological doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3: 228-237.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brannigan J. A., Dodson G., Duggleby H. J., Moody P. C., Smith J. L., Tomchick D. R., Murzin A. G. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, 378: 416-419.
- Breed R. S., Dotterer W. D. 1916. The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. *Journal of Bacteriology*, 1: 321-331.
- Brihelijs-Flohe R. 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 387: 1329-1335.
- Brisdelli F., Coccia C., Cinque B., Cifone M. G., Bozzi A. 2007. Induction of apoptosis by quercetin: different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 296: 137-149.
- Brookes P. S. 2005. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1: 12-23.
- Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. A. 1998. Structure dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330: 1173-1178.
- Buettner G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300: 535-543.

- Buettner G. R., Jurkiewicz B. A. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145: 532-541.
- Bulteau A. L., Szweda L. I., Friguet B. 2006. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Experimental Gerontology*, 41: 653-657.
- Burhans W. C., Weinberger M. 2012. DNA damage and DNA replication stress in yeast models of aging. *Subcellular Biochemistry*, 57: 187-206.
- Cabiscol E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 27393-27398.
- Camera E., Picardo M. 2002. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*, 781: 181-206.
- Carr A. C., Frei B. 1999. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions?. *FASEB Journal*, 13: 1007-1024.
- Cereser C., Guichard J., Draï J., Bannier E., Garcia I., Boget S., Parvaz P., Revol A. 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752, 1: 123-132.
- Chae H. Z., Kang S. W., Rhee S. G. 1999a. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods in Enzymology*, 300: 219-226.
- Chae H. Z., Kim H. J., Kang S. W., Rhee S. G. 1999b. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 45: 101-112.
- Chance B., Sies H., Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59: 527-605.
- Chandra Jagetia G., Rajanikant G. K., Rao S. K., Shrinath Baliga M. 2003. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clinica Chimica Acta*, 332: 111-121.

- Chaudhuri A. R., de Waal E. M., Pierce A., Van Remmen H., Ward W. F., Richardson A. G. 2006. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: a fluorescence-based proteomic approach. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127, 11: 849-856.
- Chehue Romero A., Olvera Hernández E. G., Cerón T. F., Álvarez Chávez A. 2013. The exogenous antioxidants. V: Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants. Morales-González J. A. (ed.). Rijeka, InTech: 33-57.
- Chen D., Daniel K. G., Chen M. S., Kuhn D. J., Landis-Piwowar K. R., Dou Q. P. 2005a. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 69: 1421-1432.
- Chen Q., Espey M. G., Krishna M. C., Mitchell J. B., Corpe C. P., Buettner G. R., Shacter E., Levine M. 2005b. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 13604-13609.
- Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., Khosh D. B., Drisko J., Levine M. 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 11105-11109.
- Chen Q., Thorpe J., Ding Q., El-Amouri I. S., Keller J. N. 2004. Proteasome synthesis and assembly are required for survival during stationary phase. *Free Radical Biology and Medicine*, 37: 859-868.
- Chen C., Zhou J., Ji C. 2010. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*, 87: 333-338.
- Chien S. Y., Wu Y. C., Chung J. G., Yang J. S., Lu H. F., Tsou M. F., Wood W. G., Kuo S. J., Chen D. R. 2009. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Human and Experimental Toxicology*, 28: 493-503.
- Choi H. I., Park J. I., Kim H. J., Kim D. W., Kim S. S. 2009. A novel L-ascorbic acid and peptide conjugate with increased stability and collagen biosynthesis. *BMB reports*, 42, 11: 743-746.
- Chou C. C., Yang J. S., Lu H. F., Ip S. W., Wu C. C., Lin J. P., Tang N. Y., Chung J. G., Chou M. J., Teng Y. H., Cehn D. R. 2010. Quercetin-mediated cell cycle arrest and

- apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33: 1181-1191.
- Chung S. H., Chung S. M., Lee J. Y., Kim S. R., Park K. S., Chung J. H. 1999. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS Letters*, 23: 235-240.
- Clerch L. B., Massaro D., Berkovich A. 1998. Molecular mechanisms of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia. *American Journal of Physiology*, 274: L313-L319.
- Cnubben N. H. P., Rietjens. I. M. C. M., Wortelboer H., van Zanden J., van Bladeren P. J. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- Cohen G. 1994. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738: 8-14.
- Comalada M., Camuesco D., Sierra S., Ballester I., Xaus J., Galvez J., Zarzuelo A. 2005. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *European Journal of Immunology*, 35, 2: 584-592.
- Comas J., Vives-Rego J. 1997. Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde and surfactants on *Escherichia coli* by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes. *Cytometry*, 29: 58-64.
- Conconi M., Petropoulos I., Emod I., Turlin E., Biville F., Friguet B. 1998. Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochemical Journal*, 333: 407-415.
- Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, 17: 1195-1214.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61: 71-76.

- Costa V., Amorim M. A., Reis E., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P. 1997. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*, 143: 1649-1656.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246.
- Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L. 1996. Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 801-847.
- Crow J. P. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*, 1: 145-157.
- Culotta V. C., Yang M., O'Halloran T. V. 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 747-758.
- Cyrne L., Martins L., Fernandes L., Marinho H. S. 2003. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 3: 385-393.
- da Costa Morato Nery D., da Silva C. G., Mariani D., Fernandes P. N., Pereira M. D., Panek A. D., Eleutherio E. C. 2008. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 1408-1411.
- Daroui P., Desai S. D., Li T. K., Liu A. A., Liu L. F. 2004. Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 14587-14594.
- Davey M. W., Bauw G., Van Montagu M. 1997. Simultaneous high-performance capillary electrophoresis analysis of the reduced and oxidised forms of ascorbate and glutathione. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 697, 1-2: 269-276.
- Davey M. W., Van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I. J. J., Strain J. J., Favell D., Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860.

- Davidson J. F., Schiestl R. H. 2001. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21: 8483-8489.
- Davies K. J. A. 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2: 155-173.
- Davies K. J. A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279-289.
- Davies K. J. A. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83: 301-310.
- Davies M. 2012. Free radicals, oxidants and protein damage. *Australian Biochemist*, 43: 8-12.
- De Groot H., Noll T., Sies H. 1985. Oxygen dependence and subcellular partitioning of hepatic menadione-mediated oxygen uptake. Studies with isolated hepatocytes, mitochondria and microsomes from rat liver in an oxystat system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243: 556-562.
- Delaunay A., Isnard A. D., Toledano M. B. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO Journal*, 19: 5157-5166.
- Delaunay A., Pflieger D., Barrault M. B., Vinh J., Toledano M. B. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111: 471-481.
- Delgado M. L., O'Connor J. E., Azorín I., Renau-Piqueras J., Gil M. L., Gozalbo D. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology*, 147: 411-417.
- De Nobel H., Ruiz C., Martin H., Morris W., Brul S., Molina M., Klis F. M. 2000. Cell wall perturbations in yeast result in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinases and the Slt2-mediated increase in FKS-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, 146: 2121-2123.
- De Ruyck K., Szaumkessel M., De Rudder I., Dehoorne A., Vral A., Claes K., Velghe A., Van Meerbeeck J., Thierens H. 2007. Polymorphisms in base excision repair and

- nucleotide excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutation Research*, 631: 101-110.
- de Vries S., Marres C. A. M. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 895: 205-239.
- Dias A. S., Porawski M., Alonso M., Marroni N., Collado P. S., Gonzalez-Gallego J. 2005. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation and iNOS overexpression in liver of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Nutrition*: 135, 10: 2299-2304.
- Dickson L. M., Brown A. J. P. 1998. mRNA translation in yeast during entry into stationary phase. *Molecular and General Genetics*, 259: 282-293.
- Dosenko V. E., Nagibin V. S., Tumanovskaia L. V., Zagoriĭ V. Yu, Moĭbenko A. A. 2007. The influence of quercetin on the activity of purified 20S, 26S proteasome and proteasomal activity in isolated cardiomyocytes. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 1, 1: 40-44.
- Draculic T., Dawes I. W., Grant C. M. 2000. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 36, 5: 1167-1174.
- Duarte J., Pérez-Palencia R., Vargas F., Ocete M. A., Pérez-Vizcaino F., Zarzuelo A., Tamargo J. 2001. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 133: 117-124.
- Durgo K., Vuković L., Rusak G., Osmak M., Colić Franekić J. 2007. Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 1: 69-79.
- Elahi M. M., Kong Y. X., Matata B. M. 2009. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2: 259-269.
- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11: 81-128.
- Fahey J. W., Talalay P. 1999. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 973-979.

- Fang J., Beattie D. S. 2003. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 34: 478-488.
- Farahmand S., Taierzadeh H., Farboud E. S. 2006. Formulation and evaluation of a vitamin C multiple emulsion. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11, 2: 255-261.
- Farout L., Friguet B. 2006. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8: 205-216.
- Fernandes A. P., Holmgren A. 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions as far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6: 63-74.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416: 123-129.
- Ferraresi R., Troiano L., Roat E., Lugli E., Nemes E., Nasi M., Pinti M., Garcia Fernandez M. I., Cooper E. L., Cossarizza A. 2005. Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the antioxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radical Research*, 39, 11: 1249-1258.
- Filipits M., Simon M. M., Rapatz W., Hamilton B., Ruis H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene*, 132: 49-55.
- Finn K., Lowndes N. F., Grenon M. 2011. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 1447-1473.
- Fomenko D. E., Koc A., Agisheva N., Jacobsen M., Kaya A., Malinouski M., Rutherford J. C., Siu K. L., Jin D. Y., Winge D. R., Gladyshev V. N. 2011. Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 2729-2734.
- Foury F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195: 1-10.

- Frei B., Lawson S. 1998. Vitamin C and cancer revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 11037-11038.
- Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 18515-18517.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112.
- Friguet B., Bulteau A. L., Conconi M., Petropoulos I. 2002. Redox control of 20S proteasome. *Methods in Enzymology*, 353: 253-262.
- Fu S., Davies M. J., Stocker R., Dean R. T. 1998. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochemical Journal*, 333: 519-525.
- Fuge E. K., Braun E. L., Werner-Washburne M. 1994. Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 176: 5802-5813.
- Furukawa Y., Torres A. S., O'Halloran T. V. 2004. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO Journal*, 23: 2872-2881.
- Galiazzo F., Carri M. T., Ciriolo M. R., Rotilio G. 1994. Superoxide dismutates in *Saccharomyces cerevisiae*. V: Metal ions in fungi. Winkelmann G., Winge D. R. (eds.). New York, M. Dekker: 361-390.
- Gao X. H., Bedhomme M., Veyel D., Zaffagnini M., Lemaire S. D. 2009. Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms. *Molecular Plant*, 2, 2: 218-235.
- Gao X., Dinkova-Kostova A. T., Talalay P. 2001. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 15221-15226.
- Garcera A., Barreto L., Piedrafita L., Tamarit J., Herrero E. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochemical Journal*, 398: 187-196.

- García-Descalzo L., García-López E., Alcázar A., Baquero F., Cid C. 2012. Gel electrophoresis of proteins. V: Gel electrophoresis. Principles and basics. Magdeldin S. (ed.). Rijeka, InTech: 57-68.
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D., Brown P. O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 4241-4257.
- GE Healthcare. 2004. 2-D electrophoresis. Principles and methods. Little Chalfont, Amersham Biosciences UK Ltd, GE Healthcare: 168 str.
- Gilbert H. F. 1984. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods in Enzymology*, 107: 330-351.
- Giulivi C., Pacifici R. E., Davies K. J. A. 1994. Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311: 329-341.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274: 563-567.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65: 45-80.
- Gos P., Eicher B., Kohli J., Heyer W. D. 1997. Extremely high frequency electromagnetic fields at low power density do not affect the division of exponential phase *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioelectromagnetics*, 18: 142-155.
- Goscin S. A., Fridovich I. 1972. The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 289: 276-283.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21, 6: 1037-1053.
- Gralla E. B., Kosman D. J. 1992. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Advances in Genetics*, 30: 251-319.

- Grant C. M., Collinson L. P., Roe J. H., Dawes I. W. 1996a. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 21, 1: 171-179.
- Grant C. M., MacIver F. H., Dawes I. W. 1996b. Stationary phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 22, 4: 739-746.
- Gray J. V., Petsko G. A., Johnston G. C., Ringe D., Singer R. A., Werner-Washburne M. 2004. »Sleeping beauty«: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 187-206.
- Gromozova E. N., Voychuk S. I. 2007. Influence of radiofrequency EMF on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model eucaryotic system. V: *Biophotonics and current system in biology*. Belousov L. V., Voeikov V. L. Martynyuk V. S. (eds.). New York, Academic Press: 167-175.
- Gross E., Sevier C. S., Heldman N., Vitu E., Bentzur M., Kaiser C. A., Thorpe C., Fass D. 2006. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 299-304.
- Grune T. 2002. Oxidants and antioxidative defense. *Human and Experimental Toxicology*, 21: 61-62.
- Grune T. 2000. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology*, 1: 31-40.
- Grune T., Merker K., Sandig G., Davies K. J. A. 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305: 709-718.
- Grune T., Reinheckel T., Davies K. J. A. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal*, 6: 526-534.
- Guidot D. M., McCord J. M., Wright R. M., Repine J. E. 1993. Absence of electron transport (Rho0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 26699-26703.

- Gutteridge J. M. C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41: 1819-1828.
- Gutteridge J. M. C. 1988. Lipid peroxidation: some problems and concepts. V: *Oxygen radicals and tissue injury*. Halliwell B. (ed.). FASEB, Bethesda, MD: 9-19.
- Gutteridge J. M., Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15: 129-135.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16: 33-50.
- Halliwell B. 1999a. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31: 261-272.
- Halliwell B. 1999b. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 255-259.
- Halliwell B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal*, 1: 358-364.
- Halliwell B. 1995. The biological significant of oxygen-derived species. V: *Active oxygen in biochemistry*. Valentine J. S., Foote C. S., Greenberg A., Liebman J. F. (eds.). Glasgow, Blackie Academic and Professional: 313-335.
- Halliwell B., Aruoma O. I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19.
- Halliwell B., Cross C. E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 102: 5-12.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 218: 1-14.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2000. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, Oxford University Press: 851 str.

- Halliwell B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142: 231-255.
- Harris L. R., Cake M. H., Macey D. J. 1994. Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates. *Biochemical Journal*, 301: 385-389.
- Hartwell L. H., Kastan M. B. 1994. Cell cycle control in cancer. *Science*, 266: 1821-1828.
- Haugland R. P. 2002. Nucleic acid detection and genomics technology. V: *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Gregory J. (ed.). Eugene, Molecular Probes Inc: 265-352.
- Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32: 1141-1148.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Henle E. S., Linn S. 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 19095-19098.
- Hensel M., Steurer R., Fichtl J., Elger C., Wedekind F., Petzold A., Schlothauer T., Molhoj M., Reusch D., Bulau P. 2011. Identification of potential sites for tryptophan oxidation in recombinant antibodies using tert-butylhydroperoxide and quantitative LC-MS. *PLOS ONE*, 6: e17708, doi:10.1371/journal.pone.0017708: 7 str.
- Herrero E., Ros J., Belli G., Cabisco E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 1217-1235.
- Hertog M. G., Hollman P. C., Katan M. B., Kromhout D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20: 21-29.
- Hilt W. 2004. Targets of programmed destruction: a primer to regulatory proteolysis in yeast. *Cellular and Molecular Life Science*, 61: 1615-1632.
- Hilt W., Wolf D. H. 1992. Stress-induced proteolysis in yeast. *Molecular Microbiology*, 6, 17: 2437-2442.

- Hilt W., Wolf D. H. 1996. Proteosomes: destruction as a programme. Trends in Biochemical Science, 21: 96-102.
- Hiltunen J. K., Mursula A. M., Rottensteiner H., Wierenga R. K., Kastaniotis A. J., Gurvitz A. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* FEMS Microbiology Reviews, 27: 35-64.
- Hirano R., Sasamoto W., Matsumoto A., Itakura H., Igarashi O., Kondo K. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 47: 357-462.
- Holmgren A. 2000. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. Antioxidants and Redox Signaling, 2: 811-820.
- Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. Journal of Biological Chemistry, 264, 24: 13963-13966.
- Homann M. J., Bailis A. M., Henry S. A., Carman G. M. 1987. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis by serine in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 169: 3276-3280.
- Horvath G., Young S., Latz E. 2009. Toll-like receptor interactions imaged by FRET microscopy and GFP fragment reconstitution. Methods in Molecular Biology, 517: 33-54.
- Hosaka K., Yamashita S. 1984. Regulatory role of phosphatidate phosphatase in triacylglycerol synthesis of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, 796: 110-117.
- Howlet N. G., Avery S. V. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. Applied and Environmental Microbiology, 63: 2971-2976.
- Huh W. K., Lee B. H., Kim S. T., Kim Y. R., Rhie G. E., Baek Y. W., Hwang C. S., Lee J. S. Kang S. O. 1998. D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 30: 895-903.
- Imlay J. A., Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240: 1302-1309.

- Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 2495-2505.
- Ivanov A. R., Nazimov I. V., Baratova L. A. 2000. Qualitative and quantitative determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometry and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 870, 1-2: 433-442.
- Izawa S., Inou Y., Kimura A. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 368: 73-76.
- Izawa S., Kuroki K., Inoue Y. 2004. Nuclear thioredoxin peroxidase Dot5 in *Saccharomyces cerevisiae*: roles in oxidative stress response and disruption of telomeric silencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 120-124.
- Jackson T. S., Xu A., Vita J. A., Keaney J. F. Jr. 1998. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at high physiologic concentrations. *Circulation Research*, 83: 916-922.
- Jacob H. S., Ingbar S. H., Jandl J. H. 1965. Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasia. *Journal of Clinical Investigation*, 44: 1187-1199.
- Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659-664.
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301.
- Jamieson D. J. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *Journal of Bacteriology*, 174: 6678-6681.
- Jamieson D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527.
- Jang H. H., Lee K. O., Chi Y. H., Jung B. G., Park S. K., Park J. H., Lee J. R., Lee S. S., Moon J. C., Yun J. W., Choi Y. O., Kim W. Y., Kang J. S., Cheong G. W., Yun D. J., Rhee S. G., Cho M. J., Lee S. Y. 2004. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins

- display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 117: 625-635.
- Jeffery C. J. 2003. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends in Genetics*, 19: 415-417.
- Jenner P. 1994. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet*, 344: 796-798.
- Jepras R. I., Carter J., Pearson S. C., Paul F. E., Wilkinson M. J. 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 7: 2696-2701.
- Jernaes M. W., Steen H. B. 1994. Rapid staining of *E. coli* cells for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*, 17: 302-309.
- Jovanovic S. V., Simic M. G. 2000. Antioxidants in nutrition. V: Reactive oxygen species. Chiueh C. C. (ed.). New York, The New York Academy of Sciences: 352-359.
- Jung T., Grune T. 2008. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life*, 60: 743-752.
- Kalyanaraman B., Premovic P. I., Sealy R. C. 1987. Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. An ESR spin stabilization study. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 11080-11087.
- Kessler M., Ubeaud G., Jung L. 2003. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55: 131-142.
- Khassaf M., McArdle A., Esanu C., Vasilaki A., McArdle F., Griffiths R. D., Brodie D. A., Jackson M. J. 2003. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 594: 645-652.
- Kim G. N., Jang H. D. 2009. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171: 530-537.
- Kim G. N., Kwon Y. I., Jang H. D. 2011a. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25: 138-144.

- Kim I. S., Sohn H. Y., Jin I. 2011b. Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Journal of Microbiology*, 49, 5: 816-823.
- Kitts D. D. 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 6: 198-203.
- Kisselev A. F., Goldberg A. L. 2005. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods in Enzymology*, 398: 364-378.
- 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*. Aruoma O. I., Halliwell B. (eds.). Saint Lucia, London, OICA International: 79-137.
- Koch A. L. 1994. Growth measurement. V: *Methods for general and molecular bacteriology*. Gerhardt P. (ed.). Washington, American Society for Microbiology: 248-277.
- Kontos H. A., Wei E. P., Ellis E. F., Jenkins L. W., Povlishock J. T., Rowe G. T., Hess M. L. 1985. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circulation Research*, 57: 142-151.
- Kook D., Wolf A. H., Yu A. L., Neubauer A. S., Priglinger S. G., Kampik A., Welge-Lüssen U. C. 2008. The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE *in vitro*. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*, 49, 4: 1712-1719.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21.
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37.
- Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: *Proteomika*. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. januar in 1. Februar 2008.

- Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-31.
- Kuge S., Arita M., Murayama A., Maeta K., Izawa S., Inoue Y., Nomoto A. 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Molecular and Cellular Biology*, 21: 6139-6150.
- Kuhnau J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24: 117-191.
- Langer T., Kaser M., Klanner C., Leonhard K. 2001. AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 29: 431-436.
- Laporte D., Lebaudy A., Sahin A., Pinson B., Ceschin J., Daignan-Fornier B., Sagot I. 2011. Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *Journal of Cell Biology*, 192, 6: 949-957.
- Lasch P., Petras T., Ullrich O., Backmann J., Naumann D., Grune T. 2001. Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 12: 9492-9502.
- Laughton M. J., Halliwell B., Evans P. J., Hoult J. R. S. 1989. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*, 38: 2859-2865.
- Lawrence A., Jones C. M., Wardman P., Burkitt M. J. 2003. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 29410-29419.
- LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5: 227-231.
- Lewis K. 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 503-533.
- Lewis D. L., Gattie D. K. 1991. The ecology of quiescent microbes. *ASM News*, 57: 27-32.

Life Technologies Corporation 2012a. Reagents for modifying aldehydes and ketones-Section 3.3. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 9 str.

<https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Reagents-for-Modifying-Groups-Other-Than-Thiols-or-Amines/Hydrazines-Hydroxylamines-and-Aromatic-Amines-for-Modifying-Aldehydes-and-Ketones.html>
(december 2012)

Life Technologies Corporation 2012b. The Alexa Fluor Dye Series-Note 1.1. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 2 str.

<https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/The-Alexa-Fluor-Dye-Series.html>
(december 2012)

Life Technologies Corporation 2012c. Alexa Fluor Dyes Spanning the Visible and Infrared Spectrum-Section 1.3. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 25 str.

<https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Fluorophores-and-Their-Amine-Reactive-Derivatives/Alexa-Fluor-Dyes-Spanning-the-Visible-and-Infrared-Spectrum.html?icid=fr-alexa-3>
(december 2012)

Lillie S. H., Pringle J. R. 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*, 143: 1384-1394.

Liu J., Hinkhouse M. M., Sun W., Weydert C. J., Ritchie J. M., Oberley L. W., Cullen J. J. 2004. Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Human Gene Therapy*, 15: 239-250.

Longo V. D., Gralla E. B., Valentine J. S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 12275-12280.

Lopez M. F., Berggren K., Chernokalskaya E., Lazarev A., Robinson M., Patton W. F. 2000. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis*, 21: 3673-3683.

Lopez-Amoros R., Comas J., Vives-Rego J. 1995. Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2521-2526.

- Luikenhuis S., Perrone G., Dawes I. W., Grant C. M. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 5: 1081-1091.
- Luo J. L., Hammarqvist F., Cotgreave I. A., Lind C., Andersson K., Wernerman J. 1995. Determination of intracellular glutathione in human skeletal muscle by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 670, 1: 29-36.
- Lushchak V. I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153: 175-190.
- Lushchak V. I., Semchyshyn H. M. 2012. Introductory chapter. V: Oxidative stress - molecular mechanisms and biological effects. Lushchak V. I., Semchyshyn H. M. (eds.). Rijeka, InTech: 3-12.
- Lynch S. M., Boswell S. A., Colon W. 2004. Kinetic stability of Cu/Zn superoxide is dependent on its metal ligands: Implications for ALS. *Biochemistry*, 43: 16525-16531.
- Ma D. 2001. Applications of yeast in drug discovery. *Progress in Drug Research*, 57: 117-162.
- Machlin L. J., Bendich A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, 1: 441-445.
- MacMillan-Crow L. A., Crow J. P., Kerby J. D., Beckman J. S., Thompson J. A. 1996. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allo-grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 11853-11858.
- Mahmud S. A., Hirasawa T., Shimizu H. 2010. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109: 262-266.
- Manček B., Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farmacevtski Vestnik*, 52: 133-144.
- Marchler G., Schüller C., Adam G., Ruis H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO Journal*, 12: 1997-2003.

- Marnett L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21: 361-370.
- Marques M., Mojzita D., Amorim M. A., Almeida T., Hohmann S., Moradas-Ferreira P., Costa V. 2006. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 152: 3595-3605.
- Marres C. A. M., De Vries S., Grivell L. A. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 195: 857-862.
- Martin K. R., Barrett J. C. 2002. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Human and Experimental Toxicology*, 21: 71-75.
- Martinez M. J., Roy S., Archuletta A. B., Wentzell P. D., Anna-Arriola S. S., Rodriguez A. L., Aragon A. D., Quiñones G. A., Allen C., Werner-Washburne M. 2004. Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression and identification of novel essential genes. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 5295-5305.
- Martínez-Cayuela M. 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77: 147-161.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schüller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zincfinger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO Journal*, 15: 2227-2235.
- Mates J. M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32: 595-603.
- Maxfield F. R. 2002. Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 483-487.
- May J. M., Qu Z., Li X. 2001. Requirement for GSH in recycling of ascorbic acid in endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 62: 873-881.
- May J. M., Qu Z. C., Li X. 2003. Ascorbic acid blunts oxidant stress due to menadione in endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 411: 136-144.

- McGraw P., Henry S. A. 1989. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *opi3* gene: effects on phospholipid methylation, growth and crosspathway regulation of inositol synthesis. *Genetics*, 122: 317-330.
- McIntyre M., Bohr D. F., Dominiczak A. F. 1999. Endothelial function in hypertension. *Hypertension*, 34: 539-545.
- Mehlhase J., Grune T. 2002. Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 383: 559-567.
- Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I., Hine R. J., James S. J. 1999. A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 490-497.
- Menacho-Márquez M., Marguía J. R. 2007. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clinical and Translational Oncology*, 9: 1-9.
- Metodiewa D., Dunford H. B. 1993. Medical aspects and techniques for peroxidases and catalases. V: Atmospheric oxidation and antioxidants. Vol. 3. Scott G. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 287-332.
- Metodiewa D., Jaiswal A. K., Cenas N., Dickancaite E., Segura Aguilar J. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 107-116.
- Middleton E. J., Kandaswami C. 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. V: The flavonoids: advances in research since 1986. Harborne J. B. (ed.). London, Chapman & Hall: 619-652.
- Mimica-Dukić N., Simin N., Svirčev E., Orčić D., Beara I., Lesjak M., Božin B. 2012. The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. V: Lipid peroxidation. Catala A. (ed.). Rijeka, InTech: 193-210.
- Molecular Probes. 2005. LIVE/DEAD[®] *FungaLight*[™] yeast viability kit: product information. Eugene, Molecular probes-Invitrogen detection technologies: 4 str.
- Molina M. F., Sanchez-Reus I., Iglesias I., Benedi J. 2003. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 10: 1398-1402.

- Molnar-Perl I. 2001. Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *Journal of Chromatography A*, 913: 283-302.
- 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.
- Moskovitz J. 2005. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703: 213-219.
- Muller E. G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 11: 1805-1813.
- Müller B., Grossniklaus U. 2010. Model organisms - a historical perspective. *Journal of Proteomics*, 73: 2054-2063.
- Muscari C., Pappagallo M., Ferrari D., Giordano E., Capanni C., Caldarera C. M., Guarnieri C. 1998. Simultaneous detection of reduced and oxidized glutathione in tissues and mitochondria by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 707, 1-2: 301-307.
- Murphy M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417: 1-13.
- Nagaoka S., Okauchi Y., Urano S., Nagashima U., Mukai K. 1990. Kinetic and ab initio study of the prooxidant effect of vitamin E: hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin. *Journal of the American Chemical Society*, 112: 8921-8924.
- Naidu K. A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal*, 2, 7: 7-23.
- Nardini M., Finkelstein E. I., Reddy S., Valacchi G., Traber M., Cross C. E., van der Vliet A. 2002. Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Toxicology*, 170: 173-185.
- Nemeikaite-Ceniene A., Imbrasaitė A., Sergedienė E., Cenas N. 2005. Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441: 182-190.

- Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
- Nishikimi M. 1975. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 63: 463-468.
- Nohl H., Kozlov A. V., Gille L., Staniek K. 2003. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1308-1311.
- Nordberg J., Arnér E. S. J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 11: 1287-1312.
- Oberley L. W. 2005. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59: 143-148.
- Okai Y., Higashi-Okai K., Machida K., Nakamura H., Nakayama K., Fujita K., Tanaka T., Otani S., Taniguchi M. 2000. Protective effect of antioxidants against par-nonylphenol-induced inhibition of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 185: 65-70.
- Overkamp K. M., Bakker B. M., Kötter P., van Tuijl A., de Vries S., van Dijken J. P., Pronk J. T. 2000. *In vivo* analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of Bacteriology*, 182: 2823-2830.
- Oztopcu-Vatan P., Kabadere S., Uyar R. 2009. The effect of pretreatment or combined treatment of quercetin on menadione toxicity in rat primary mixed glial cells *in vitro*. *Cytotechnology*, 61: 11-16.
- Özsavci D. 2007. Oxidative DNA damage and repair system. *Advances in Molecular Medicine*, 3: 57-61.
- Pacifici R. E., Davies K. J. A. 1990. Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods in Enzymology*, 186: 485-502.
- Padgett C. M., Whorton A. R. 1998. Cellular responses to nitric oxide: role of protein S-thiolation/dethiolation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 358: 232-242.

- Pandey K. B., Rizvi S. I. 2010. Protection of protein carbonyl formation by quercetin in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Medicinal Chemistry Research*, 19: 186-192.
- Park S. G., Cha M. K., Jeong W., Kim I. K. 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 5723-5732.
- Parmentier C., Leroy P., Wellman M., Nicolas A. 1998. Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 719, 1-2: 37-46.
- Parola M., Bellomo G., Robino G., Barrera G., Dianzani M. U. 1999. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 1: 255-284.
- Paroni R., De Vecchi E., Cighetti G., Arcelloni C., Fermo I., Grossi A., Bonini P. 1995. HPLC with o-phthalaldehyde precolumn derivatization to measure total, oxidized, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue. *Clinical Chemistry*, 41, 3: 448-454.
- Parsons A. B., Geyer R., Hughes T. R., Boone C. 2003. Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Progress in Cell Cycle Research*, 5: 159-166.
- Pastor N., Weinstein H., Jamison E., Brenowitz M. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of Molecular Biology*, 304: 55-68.
- Pennisi E. 2003. Human genome: a low number wins the GeneSweep Pool. *Science*, 300: 1484
- Petropoulos I., Friguet B. 2005. Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703: 261-266.
- Pinon R. 1978. Folded chromosomes in non-cycling yeast cells: evidence for a characteristic G₀ form. *Chromosoma*, 67: 263-274.
- Pistelli L., Giorgi I. 2012. Antimicrobial properties of flavonoids. V: Dietary phytochemicals and microbes. Patra A. K. (ed.). Dordrecht, Springer: 33-91.

- Poon H. F., Abdullah L., Reed J., Doore S. M., Laird C., Mathura V. Mullan M., Crawford F. 2007. Improving image analysis in 2DGE-based redox proteomics by labelling protein carbonyl with fluorescent hydroxylamine. *Biological Procedures Online*, 9, 1: 65-72.
- Poppek D., Grune T. 2006. Proteasomal defense of oxidative modifications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8: 173-184.
- Pringle J. R., Hartwell L. H. 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. V: Molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: life cycle and inheritance. Broach J. R., Strathern J., Jones E. (eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 97-142.
- Priyadarsini R. V., Murugan R. S., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunakaran D., Nagini S. 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kB inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 649: 84-91.
- Promega. 2007. BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay: technical bulletin. 2007. Madison, Peomega Corporation: 16 str.
- Puddu P., Puddu G. M., Cravero E., Rosati M., Muscari A. 2008. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Pressure*, 17: 70-77.
- Purdue P. E., Lazarow P. B. 2001. Peroxisome biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 701-752.
- Raha S., Robinson B. H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25: 502-508.
- Ratnam D. V., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K., Kumar M. N. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113: 189-207.
- Ravindranath S. D., Fridovich I. 1975. Isolation and characterisation of a manganase-containing superoxide dismutase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 15: 6107-6112.
- Reinheckel T., Sitte N., Ullrich O., Kuckelkorn U., Davies K. J., Grune T. 1998. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 335: 637-642.

- Reinheckel T., Ullrich O., Sitte N., Grune T. 2000. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377: 65-68.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956.
- Rikans L. E., Hornbrook K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1362: 116-127.
- Robaszekiewicz A., Balcerzyk A., Bartosz G. 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology International*, 31: 1245-1250.
- Rodriguez-Manzanegue M. T., Ros J., Cabiscol E., Sorribas A., Herrero E. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 12: 8180-8190.
- Ross D., Thor H., Orrenius S., Moldeus P. 1985. Interaction of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) with glutathione. *Chemico-Biological Interactions*, 55: 177-184.
- Rothe G., Valet G. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, 47: 440-448.
- Rouhier N., Lemaire S. D., Jacquot J. P. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 143-166.
- Royall J. A., Ischiropoulos H. 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302: 348-355.
- Ruis H., Hamilton B. 1992. Regulation of yeast catalase genes. V: Molecular biology of free radical scavenging systems. Scandalios J. G. (ed.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 153-172.
- Santos P. M., Simões T., Sá-Correia I. 2009. Insights into yeast adaptive response to the agricultural fungicide mancozeb: a toxicoproteomics approach. *Proteomics*, 9: 657-670.

- Saran M., Bors W. 1991. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klinische Wochenschrift*, 69: 957-964.
- Sassi N., Biasutto L., Mattarei A., Carraro M., Giorgio V., Citta A., Bernardi P., Garbisa S., Szabò I., Paradisi C., Zoratti M. 2012. Cytotoxicity of a mitochondriotropic quercetin derivative: Mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817: 1095-1106.
- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, Suppl. S: 2073S-2085S.
- Schafer F. Q., Buettner G. R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 1191-1212.
- Schwartz J. L. 1996. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *Journal of Nutrition*, 126, Suppl. S: 1221S-1227S.
- Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R., Baumeister W. 1995. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 268: 579-582.
- Seibert H., Maser E., Schweda K., Seibert S., Güllden M. 2011. Cytoprotective activity against peroxide-induced oxidative damage and cytotoxicity of flavonoids in C6 rat glioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2398-2407.
- Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2002. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska založba: 182 str.
- Shang F., Gong X., Taylor A. 1997. Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 37: 23086-23093.
- Sharova N. P., Stroeveva O. G., Erokhov P. A., Dimitrieva S. B., Usova T. A. 2007. Changes in the activity of proteasomes *in vivo* induced by oxidative stress or para-aminobenzoic acid in loach embryos. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 415: 197-199.
- Sherman F. 1991. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 194: 3-21.
- Shi Q., Jackowski G. 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. V: Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 3rd ed. Hames B. D. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 1-52.

- Shringarpure R., Grune T., Davies K. J. A. 2001. Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1442-1450.
- Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K. J. 2003. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 311-318.
- Sies H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25: 1058-1071.
- Sies H. 1991a. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, Suppl. 3C: 31S-38S.
- Sies H. 1991b. Oxidative stress: introduction. V: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Sies H. (ed.). London, Academic Press: 15-22.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms-I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44, 6: 587-624.
- Silva M. M., Santos M. R., Caroco G., Rocha R., Justino G., Mira L. 2002. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a reexamination. *Free Radical Research*, 36: 1219-1227.
- Simon J. A., Bedalov A. 2004. Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nature Reviews*, 4: 1-8.
- Singer M. S., Kahana A., Wolf A. J., Meisinger L. L., Peterson S. E., Goggin C., Mahowald M., Gottschling D. E. 1998. Identification of high-copy disrupters of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150: 613-632.
- Smirnoff N. 2001. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitamins and Hormones*, 61: 241-266.
- Smith N. C., Dunnett M., Mills P. C. 1995. Simultaneous quantitation of oxidised and reduced glutathione in equine biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 673, 1: 35-41.
- Sohal R. S., Allen R. G. 1990. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Experimental Gerontology*, 25: 499-522.

- Soleas G. J., Grass L., Josephy P. D., Goldberg D. M., Diamandis E. P. 2006. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35: 492-497.
- Song L., Xu M., Lopes-Virella M. F., Huang Y. 2001. Quercetin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells through extracellular signal regulated kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391: 72-78.
- Soria E. A., Eynard A. R., Bongiovanni G. A. 2010. Cytoprotective effects of silymarin on epithelial cells against arsenic-induced apoptosis in contrast with quercetin cytotoxicity. *Life Science*, 87: 309-315.
- Squadrito G. L., Jin X., Pryor W. A. 1995. Stopped-flow kinetic study of the reaction of ascorbic acid with peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322: 53-59.
- Stadtman E. R. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40: 1250-1258.
- Stadtman E. R., Levine R. L. 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 191-208.
- Stadtman E. R., Van Remmen H., Richardson A., Wehr N. B., Levine R. L. 2005. Methionine oxidation and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703: 135-140.
- Staedler D., Idrizi E., Kenzaoui B. H., Juillerat-Jeanneret L. 2011. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68: 1161-1172.
- Starkov A. A. 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147: 37-52.
- Steinberg T. H., Chernokalskaya E., Berggren K., Lopez M. F., Diwu Z., Haugland R. P., Patton W. F. 2000. Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain. *Electrophoresis*, 21: 486-496.
- Stevenson D. E. 2012. Polyphenols as adaptogens-the real mechanism of the antioxidant effect?. V: *Bioactive compounds in phytomedicine*. Rasooli I. (ed.). Rijeka, InTech: 143-162.
- Stickland L. 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *Journal of General Microbiology*, 5: 698-700.

- Sturgeon C. M., Kemmer D., Anderson H. J., Roberge M. 2006. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnology Journal*, 1: 289-298.
- Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R., Culotta V. C. 2001. A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 38084-38089.
- Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Irani K., Finkel T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270: 296-299.
- Temple M. D., Perrone G. G., Dawes I. W. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, 15: 319-326.
- Toledano M. B., Kumar C., LeMoan N., Spector D., Tacnet F. 2007. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Letters*, 581: 3598-3607.
- Townsend D. M. 2007. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Molecular Intervention*, 7, 6: 313-324.
- Trotter E. W., Grant C. M. 2005. Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4, 2: 392-400.
- Tsao C. S. 1997. An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry. V: Vitamin C in health and disease. Packer L., Fuchs J. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc: 25-58.
- Tsukuda T., Fleming A. B., Nickoloff J. A., Osley M. A. 2005. Chromatin remodeling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 438: 379-383.
- Tu B. P., Ho-Schleyer S. C., Travers K. J., Weissman J. S. 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 290: 1571-1574.
- Tu B. P., Weissman J. S. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *Journal of Cell Biology*, 164: 341-346.
- Turrens J. F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17: 3-8.

- Turrens J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552: 335-344.
- Tyson J., Mathers J. C. 2007. Dietary and genetic modulation of DNA repair in healthy human adults. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66: 42-51.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84.
- van Acker S. A., Tromp M. N., Haenen G. R., van der Vijgh W. J., Bast A. 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214: 755-759.
- van Loon A. P., Pesold-Hurt B., Schatz G. 1986. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 3820-3824.
- Varadharaj S., Watkins T., Cardounel A. J., Garcia J. G., Zweier J. L., Kuppusamy P., Natarajan V., Parinandi N. L. 2005. Vitamin C-induced loss of redox-dependent viability in lung microvascular endothelial cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7, 1-2: 287-300.
- Vergara R., Parada F., Rubio S., Pérez F. J. 2012. Hypoxia induces H₂O₂ production and activates antioxidant defence system in grapevine buds through mediation of H₂O₂ and ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 63: 4123-4131.
- Verrax J., Taper H., Buc Calderon P. 2008. Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy. *Current Molecular Pharmacology*, 1: 80-92.
- Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 20: 1677-1694.
- Vessal M., Hemmati M., Vasei M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 135: 357-364.
- Vlamiš-Gardikas A., Holmgren A. 2002. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods in Enzymology*, 347: 286-296.

- Voges D., Zwickl P., Baumeister W. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 1015-1068.
- Walker G. M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester, John Wiley and Sons: 350 str.
- Wang H., Joseph J. A. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 612-616.
- Wemmie J. A., Steggerda S. M., Moye-Rowley W. S. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 7908-7914.
- Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G. C., Singer R. A. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57: 383-401.
- Westermeier R. 2007. Frequently made mistakes in electrophoresis. *Proteomics*, 1: 60-63.
- Williams S. C., Hong Y., Danavall D. C. A., Howard-Jones M. H., Gibson D., Frischer M. E., Verity P. G. 1998. Distinguishing between living and nonliving bacteria: evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 225-236.
- Wolf D. H. 2004. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 1615-1632.
- Yan C. C., Huxtable R. J. 1995. Fluorimetric determination of monobromobimane and o-phthalaldehyde adducts of gamma-glutamylcysteine and glutathione: application to assay of gamma-glutamylcysteinyl synthetase activity and glutathione concentration in liver. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 672, 2: 217-224.
- Yanagida M. 2009. Cellular quiescence: are controlling genes conserved?. *Trends in Cell Biology*, 19: 705-715.
- Yang C. S., Chou S. T., Liu L., Tsai P. J., Kuo J. S. 1995. Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 674, 1: 23-30.

- Yeh S. L., Wang W. Y, Huang C. H., Hu M. L. 2005. Pro-oxidative effect of β -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 729-735.
- Yen G. C., Duh P. D., Tsai H. L., Huang S. L. 2003. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67: 1215-1222.
- Yoshida M., Toshiyuki S., Nobuko H., Nobuyuki M., Matsumoto K., Fujioka A., Nishino H., Aoike A. 1990. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Letters*, 260: 10-13.
- Zadziński R., Fortuniak A., Biliński T., Grey M., Bartosz G. 1998. Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 44, 4: 747-759.
- Zbikowska H. M., Nowak P., Wachowicz B. 2006. Protein modification caused by a high dose of gamma irradiation in cryo-sterilized plasma: protective effects of ascorbate. *Free Radical Biology and Medicine*, 40: 536-542.
- Zhang Y., Marcillat O., Giulivi C., Ernster L., Davies K. J. A. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 16330-16336.
- Ziegler D. M. 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 305-329.

ZAHVALA

"Naučili so me, da pot napredka ni ne hitra ne lahka."

Marie Curie

Ko se ob zaključevanju pisanja doktorske naloge ozrem nazaj, na čas in trud, ki sem ga vložila v nalogo ugotovim, da sem opravila veliko dela in, da je za mano veliko dnevorov, ki so se zavlekli v večere, veliko prekratkih noči in neprespanih dni. Vendar vse to odtehta zadovoljstvo ob doseženem in misel na to, da sem imela ves ta čas ob sebi ljudi, ki so mi pomagali in me podpirali.

Srečnega konca vsekakor ne bi bilo brez moje mentorice izr. prof. dr. Polone Jamnik. Hvala, Polona. Ne samo zato, ker ste mi ponudili mentorstvo, temveč tudi zato, ker ste mi v vseh letih nastajanja doktorske disertacije dali mnogo več, kot lahko mladi raziskovalec pričakuje od svojega mentorja. Hvala vam za vaše nasvete, spodbude, pogovore, priložnosti, časovno in moralno podporo ter hvala za vsakič, ko ste mi stopili v bran. Skozi vsa leta ste me vodili, a mi istočasno puščali dovolj svobode. Hvala za vse lepe in nepozabne trenutke, ki sva jih skupaj preživeli tekom mojega študija in nastajanja disertacije. Še posebno lepe spomine bom za vedno ohranila na Heidelberg ☺. Polona, upam, da res velja, da "prve ne pozabiš nikoli", saj ne dvomim v to, da sem le ena od mnogih, ki je stopila na znanstveno pot in doktorirala pod vašim okriljem.

Članoma komisije prof. dr. Branki Javornik in prof. dr. Samu Kreftu se zahvaljujem za pregled doktorske disertacije ter pripombe in popravke, ki so jo še izboljšale.

Za pomoč pri statističnih analizah rezultatov se zahvaljujem prof. dr. Lei Demšar.

Matej, hvala tudi tebi. Vedno si priskočil na pomoč, ko je bila panika v laboratoriju zaradi tehničnih težav ali okvare aparatur. Hvala tudi za pomoč pri vseh računalniških zadevah in problemih, ki so se večkrat zgodili ravno in samo meni. Včasih si težavo rešil že samo s prisotnostjo svoje avre :).

Velikokrat me je iz zagate ob pomanjkanju ali pri naročilih kemikalij ter materiala rešila gospa Milena Žabkar, za katero upam, da neskončno uživa z vnuki v pokoju. Po njeni upokojitvi me je iz tovrstnih zagat reševala Saša Piskernik. Hvala obema.

Janko, bil si najboljši, najbolj prijazen in pozoren cimer ever.

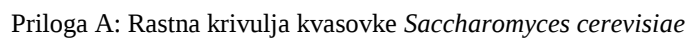
Ko sem se znašla v zapletenem svetu papirologije, postopkov in pravil sem se vedno lahko obrnila na našo Dragico Marković. Dragejša, hvala ti za vse.

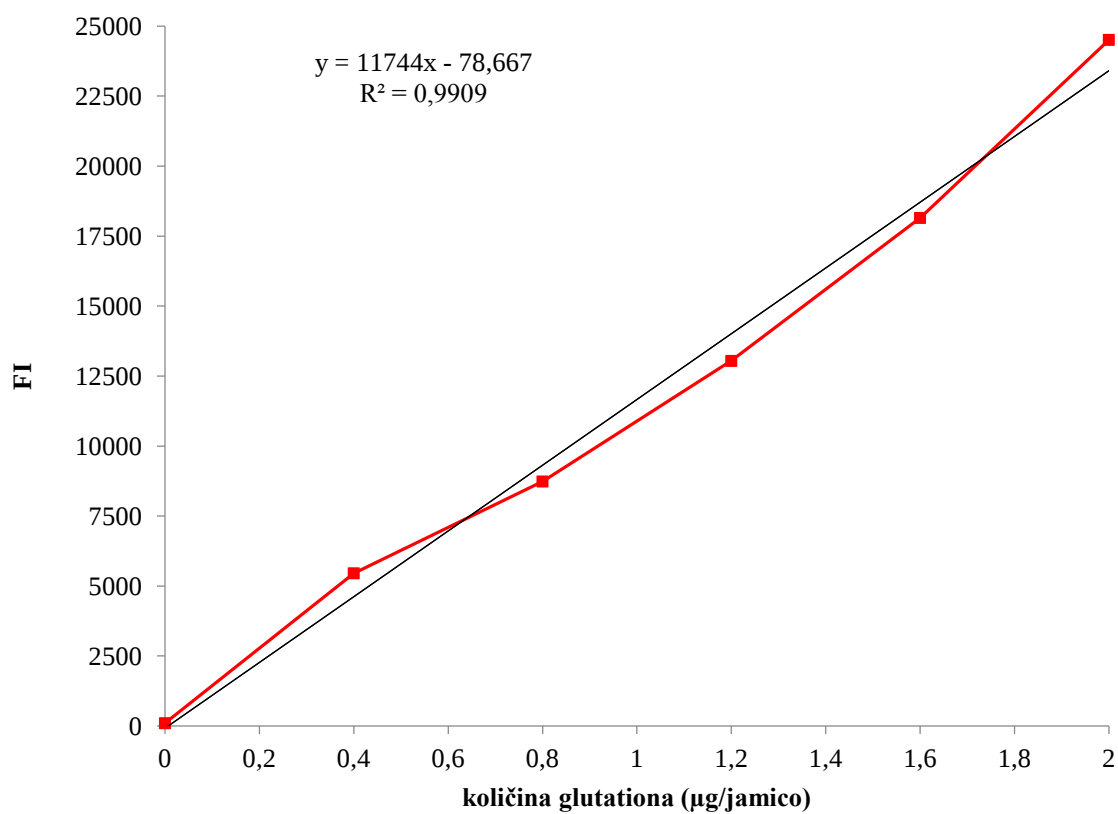
Hvala vsem tistim, zaradi katerih je bil čas kosila in kavic nadvse prijeten. Predvsem hvala Kseniji, Lini, Tamari, Ajdi in Katji za dobro družbo na fakulteti, kot tudi nepozabna druženja izven nje. Zaradi vas je bilo velikokrat vse lažje, bolj veselo in zabavno.

Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za čas, ki si ga je vzela in skrbno pregledala obliko naloge in navajanje virov.

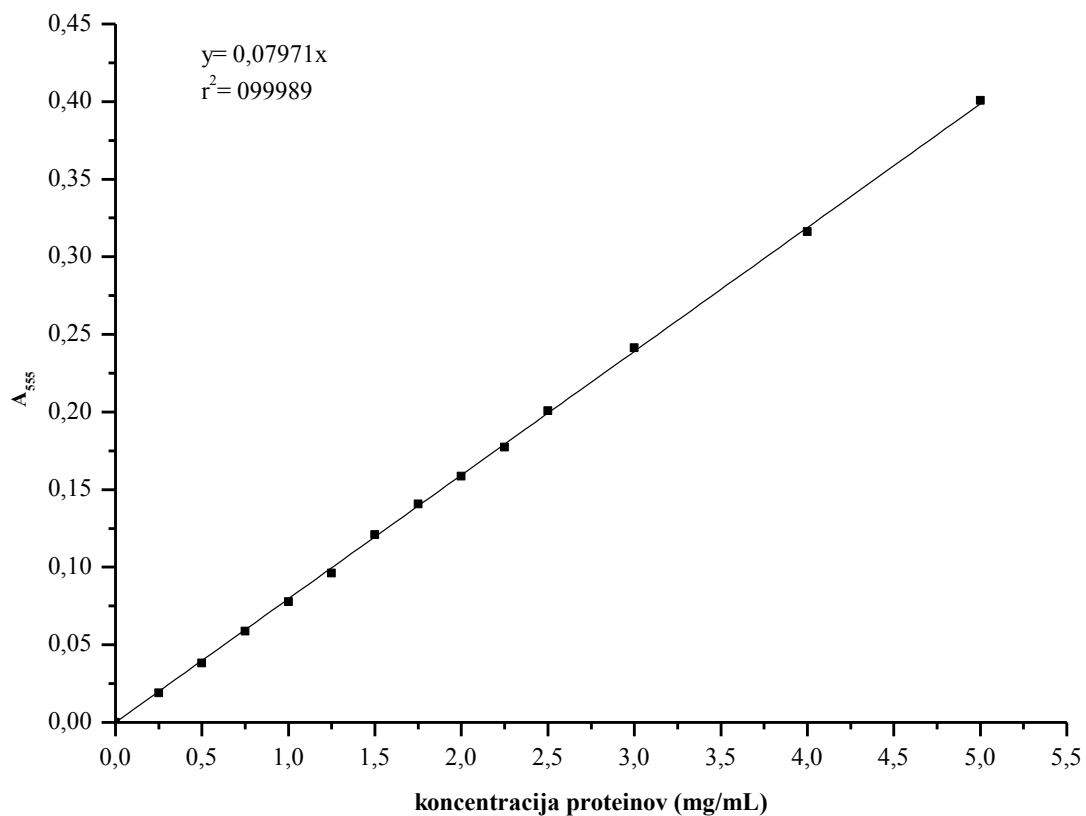
Rada bi se zahvalila tudi vsem ostalim, ki so mi tekom nastajanja doktorske disertacije kakor koli pomagali. Tu gre še posebna zahvala izr. prof. dr. Barbari Jeršek. Hvala vam za ponujeno priložnost in zaupanje.

Ne nazadnje pa gre največja zahvala mojim staršem. Hvala vama, da sta me podpirala, me bodrila in mi stala ob strani tudi v najtežjih trenutkih. Preprosto ni besed, s katerimi bi izrazila svojo hvaležnost za vajino ljubezen, podarjen čas, skrb, razumevanje in podporo. Vedno in povsod. Zaradi vaju sem to, kar sem in zaradi vaju sem v življenju dosegla že veliko zmag-tudi del te zmage je vaju! Saško, hvala tudi tebi-velikokrat si odlično odigral vlogo starejšega brata.

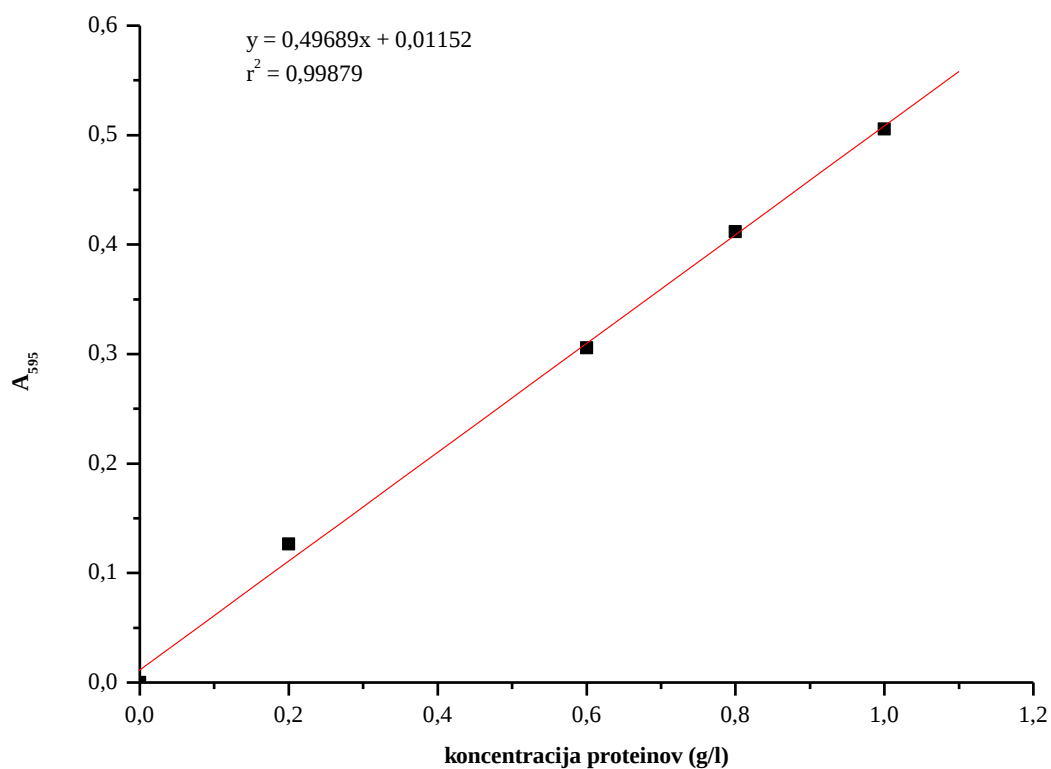




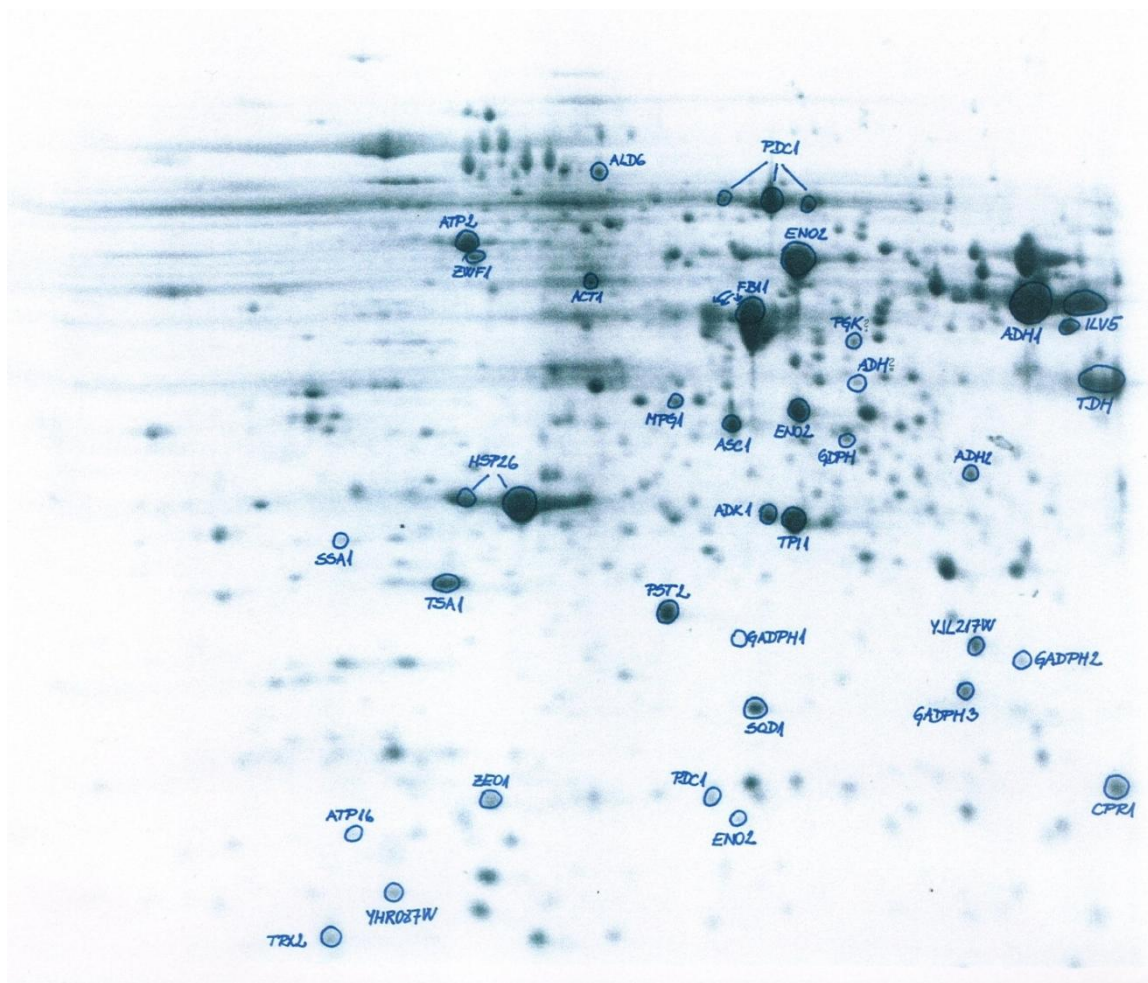
Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje količine glutationa v reducirani obliki



Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije skupnih proteinov v biomasi kvasovke *S. cerevisiae* (metoda po Sticklandu)



Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu kvasovke *S. cerevisiae* (metoda po Bradfordu)



Priloga E: Proteinska mapa celokupnih proteinov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155

Priloga F: Pregled izmerjenih absolutnih vrednosti luminiscenčne intenzitete (LI) za določanje celične metabolne energijske aktivnosti, fluorescenčne intenzitete (FI) za oceno znotrajcelične oksidacije in določanje živosti preko integritete membrane ter A_{650} za določanje optične gostote tekom kultivacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 v gojišču YEPD

čas kultivacije (h)		13	36	60	72	84
celična energijska metabolna aktivnost	LI	303073	934845	1659500	2188050	1767475
		316348	1022735	2275250	1531525	1694950
		226810	1279500	1450450	2211950	1215975
		257068	948630	1864775	1907550	1470000
		278750	1071800	2204550	2136225	1371575
		297185	1132300			1505475
	povprečje LI	279872	1064968	1890905	1995060	1504242
znotrajcelična oksidacija	FI	33824	23337	14015	14329	17665
		33388	30677	13204	12210	17098
		35735	24042	14984	14490	18592
		33864	28271		13097	
	povprečje FI	34203	26581	14068	13531	17785
živost	FI	55788	62113	52238	50364	40471
		48853	61761	45695	40303	46957
		48901	62545	49568	51477	43021
		59318	61431	49767	39092	47913
	povprečje FI	51495	61787			
optična gostota	A_{650}	52871	61927	49317	45309	44590
		1,002	1,562	1,552	1,604	1,601
		1,005	1,547	1,615	1,633	1,658
		1,003	1,555	1,632	1,640	1,622
		1,007	1,531	1,629	1,637	1,600
			1,551			
	poprečje A_{650}	1,004	1,549	1,607	1,628	1,620

Priloga G: Meritve luminiscenčne intenzitete (LI) za določanje celične metabolne energijske aktivnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

čas inkubacije (h)	LI					povprečje LI
0	4,2E+06	4,1E+06	4,3E+06	4,0E+06		4,18E+06
24	3,1E+06	2,7E+06	3,0E+06			2,89E+06
96	1,2E+06	1,9E+06	1,6E+06			1,59E+06
120	1,3E+06	1,6E+06	1,3E+06	1,8E+06	1,4E+06	1,46E+06
144	1,2E+06	8,3E+05	6,7E+05	1,2E+06	9,6E+05	9,63E+05
168	5,7E+05	4,6E+05	6,9E+05	5,0E+05		5,56E+05
192	2,3E+05	1,5E+05	4,5E+05	3,6E+05		2,97E+05
264	3,2E+05	2,3E+05	1,7E+05	1,8E+05	1,4E+05	2,09E+05
288	4,6E+05	3,0E+05	2,4E+05	1,4E+05	1,3E+05	2,52E+05
312	1,8E+05	1,9E+05	1,5E+05	1,0E+05	8,8E+04	1,40E+05
336	6,1E+04	6,2E+04	6,3E+04	6,7E+04		6,33E+04
360	3,8E+04	4,2E+04	4,2E+04	4,4E+04		4,13E+04
432	4,4E+04	4,5E+04	4,3E+04	4,5E+04		4,42E+04
456	6,9E+04	5,7E+04	6,2E+04	5,9E+04		6,16E+04
504	4,6E+04	5,0E+04	5,6E+04	6,1E+04		5,32E+04
528	2,5E+04	2,2E+04	2,2E+04	2,3E+04		2,30E+04
600	2,3E+04	2,2E+04	2,2E+04	2,4E+04		2,27E+04
624	6,0E+04	5,5E+04	5,2E+04	5,4E+04		5,52E+04
648	8,5E+04	7,7E+04	7,0E+04	7,0E+04		7,56E+04

Priloga H: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za oceno znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

čas inkubacije (h)	FI					povprečje FI
0	21722	21990	22529	24584		22706
24	14431	19050	18102	13381	16012	16195
96	14640	13821	13728			14063
120	16133	14076	11462	12429		13525
144	14462	17708	17081	11187	11063	14300
168	15502	16781	11300			14528
192	14219	11599	13997			13272
264	19153	19125	16035	18370		18171
288	22782	22162	28323	29718		25746
312	24909	21888	21469	28085	28285	24927
336	22660	24683	23996	22638		23494
360	25697	23329	22977	27043		24762
432	22436	23935	23984	24280		23658
456	26389	26315	27716	25525		26486
504	20517	21164	19124	19473		20070
528	25483	22977	19973	23241		22918
600	26222	28613	26816	29763		27854
624	18175	18079	20203	20255		19178
648	23528	23043	24109	25356		24009

Priloga I: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje živosti preko integritete membran kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

čas inkubacije (h)	FI				povprečje FI
0	8317,8	7573,8			7945,8
24	5380,5	5114,5			5247,5
144	5517,5	5366,0			5441,8
168	5202,0	4804,5			5003,3
192	5425,5	5176,3			5300,9
264	4362,8	4046,3			4204,5
288	4352,8	4069,0			4210,9
336	2606,5	2528,5	2644,5	2667,5	2611,8
360	2286,0	2234,0	2311,0	2256,0	2271,8
432	2331,0	2285,0	2366,0	2371,0	2338,3
456	2823,0	2750,0	2794,0	2752,0	2779,8
504	3104,5	3033,5	3074,5	3146,5	3089,8
528	3424,0	3354,0	3391,0	3392,0	3390,3
600	2582,5	2516,5	2525,5	2460,5	2521,3
624	2125,0	2136,0	2283,0	2088,0	2158,0
648	2166,0	2173,0	2242,0	2285,0	2216,5

Priloga J: Meritve CFU/mL za določanje kultivabilnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 tekom 648-urne inkubacije v pufru PBS

čas inkubacije (h)	CFU/mL	povprečje CFU/mL
0	1,58E+08 1,59E+08 1,60E+08	1,59E+08
24	1,49E+08 1,58E+08	1,54E+08
96	1,36E+08 1,44E+08	1,40E+08
120	1,28E+08 1,30E+08 1,46E+08	1,35E+08
144	1,27E+08 1,63E+08 1,37E+08	1,42E+08
168	1,52E+08 1,32E+08 1,37E+08	1,40E+08
264	1,18E+08 1,28E+08	1,23E+08
288	1,19E+08 1,29E+08	1,24E+08
312	1,28E+08 1,02E+08	1,15E+08
336	1,11E+08 9,30E+07 8,80E+07	9,73E+07
360	1,20E+08 9,40E+07 8,10E+07	9,83E+07
432	9,40E+07 9,80E+07 1,02E+08 1,08E+08	1,01E+08
456	1,01E+08 9,70E+07 9,40E+07 9,30E+07 1,06E+08	9,82E+07
504	8,30E+07 1,08E+08 8,40E+07 9,20E+07 9,10E+07	9,16E+07
600	1,02E+08 9,80E+07	1,00E+08
648	9,10E+07 8,80E+07 8,30E+07	8,73E+07

Priloga K: Meritve luminiscenčne intenzitete (LI) za določanje celične energijske metabolne aktivnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

kultura		LI			
kultura 4 h tretirana z antioksidantom	kontrola	1341675	1286350	1346025	1419725
	AK	3214775	3015600	1387500	1567500
	kontrola	270890	278075	258403	224010
	Q	276225	309893	312108	250385
kultura 24 h tretirana z antioksidantom	kontrola	108395	165648	136910	117270
	AK	119405	147055	143110	136870
	kontrola	573898	572378	686925	720443
	Q	655365	667123	816375	864153
kultura 4 h predtretirana z antioksidantom in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	139590	128300	238440	
	M	93896	66647	137833	
	AK-M	43113	46070	77221	
	kontrola	139590	128300	238440	
	M	93896	66647	137833	
	Q-M	82263	71367	127353	
kultura 24 h predtretirana z antioksidantom in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	250710	742168	657710	
	M	117998	309878	341790	
	AK-M	39957	122480	122740	
	kontrola	742168	657710	152138	
	M	309878	341790	86263	
	Q-M	507318	450923	103975	

Priloga L: Meritve CFU/mL za določanje kultivabilnosti kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

kultura		CFU/mL			
kultura 4 h tretirana z antioksidantom	kontrola	2,77E+07	3,00E+07	2,85E+07	2,20E+07
	AK	2,85E+07	2,80E+07	2,45E+07	1,90E+07
	Q	2,27E+07	2,67E+07	2,25E+07	2,60E+07
kultura 24 h tretirana z antioksidantom	kontrola	2,50E+07	3,15E+07	1,95E+07	1,70E+07
	AK	1,70E+07	1,20E+07	1,10E+07	1,00E+07
	Q	3,20E+07	2,43E+07	3,03E+07	2,53E+07
kultura 4 h predtretirana z antioksidantom in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	2,00E+07	1,87E+07		
	M	1,62E+06	1,54E+06		
	AK-M	1,72E+06	1,40E+06		
	Q-M	4,00E+06	4,03E+06		
kultura 24 h predtretirana z antioksidantom in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	1,25E+07	1,30E+07	1,53E+07	
	M	2,20E+06	2,05E+06	2,15E+06	
	AK-M	2,52E+06	2,32E+06	2,37E+06	2,20E+06
	Q-M	3,80E+06	3,37E+06	4,10E+06	

Priloga M: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po tretiranju z askorbinsko kislino

čas merjenja (min)	normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD ₆₅₀)														
	kontrola				kultura 4 h tretirana z askorbinsko kislino				kontrola				kultura 24 h tretirana z askorbinsko kislino		
0	25608	21022	21261	19472	26072	17624	24152	20668	20280	19424	19485	18370	19798	21505	
2	27317	21906	22408	20482	26914	18132	25624	21860	20771	19663	20126	18655	20078	22684	
4	28500	22597	23314	22133	28266	18848	27317	23575	21322	20480	21165	19480	20663	23542	
6	29372	23825	24285	23177	29434	20114	28465	25063	21826	20922	22102	19988	21219	24186	
8	30703	24952	25938	24432	30506	20781	30184	26536	22649	21875	23091	20650	21852	25139	
10	31980	25941	27259	25947	31789	21958	31647	28004	23473	22859	24064	21491	22615	25918	
12	33613	27261	28848	27697	33504	22412	33411	29806	24196	23476	25150	22201	23367	27306	
14	34900	28584	29975	29286	34030	23853	34984	31850	24806	24569	26229	22819	24246	28560	
16	36142	29614	31280	31460	35927	24987	36732	33877	25508	25139	27409	23748	25051	29776	
18	37599	30839	33241	33598	36983	26196	38619	36234	26654	26163	28527	24699	26333	30850	
20	39092	32259	34465	35477	38661	27327	40791	38417	27195	27267	29698	25781	26868	31942	
22	40860	33771	36449	38402	39356	28824	42767	41234	28340	28083	30993	26887	28403	33070	
24	42099	35088	37929	40361	40904	30312	45428	43456	29188	29103	32252	27719	29539	34962	
26	43792	37005	40045	43211	42336	31831	47751	46468	29812	30087	33188	28685	30596	35712	
28	45648	38122	42045	46034	43769	33423	49936	49043	31106	30803	34803	30086	31835	37162	
30	47298	39515	43893	48919	45112	35345	52549	52319	32128	32003	35463	31196	33230	38592	
32	48394	41361	45841	52436	46475	36788	55159	55899	32763	32921	36918	32513	34487	40195	
34	49777	42655	47817	55429	48312	38942	57959	60116	33815	34012	38540	33844	35947	41787	
36	51316	44395	50757	59581	49760	40394	61049	64250	34955	35355	39861	34783	37231	43006	
38	53221	46461	52980	63320	50944	42371	64076	68246	36054	36831	41301	36622	38825	44892	
40	54793	48395	56076	68416	52500	44750	68051	73818	37303	37612	42211	38036	40026	46908	
42	56428	50355	58900	72955	53677	46682	71990	78720	38562	39070	44488	39921	41813	48405	
44	58470	52310	61897	77537	55707	48642	75674	84317	39531	40168	46363	41764	43620	50025	
46	60669	54401	64765	83525	57367	50841	79782	91035	40863	42366	47496	43034	45416	52479	
48	61689	56621	68489	89359	59151	53272	84997	97225	42188	43440	48821	45049	46785	54179	
50	64191	58707	71517	95608	60796	55826	88968	103661	43316	45257	50492	46535	48863	55941	
52	66355	60820	75235	101268	62480	58324	94261	110591	44928	46993	52566	48644	51028	58253	
54	68224	63438	79085	107873	63899	61161	98157	117345	46118	48507	54329	50139	53200	60541	
56	70161	66575	82727	113918	66462	64265	104463	124281	47094	50030	55918	52131	54718	62603	
58	72423	68665	86058	120474	68697	67116	109449	131679	48869	51565	58002	54360	57066	64680	
60	74617	71785	90605	126479	70546	70101	114287	139410	50529	53895	59742	55859	59243	67008	
62	76990	73992	94001	134131	71747	72968	119479	147612	51647	55211	61593	57907	60904	69625	
64	78676	76733	98254	141278	73650	76438	124571	155039	53511	56694	63958	59901	63664	71807	
66	81227	79342	102366	148113	75675	79539	130617	163172	55058	58610	65763	62366	65886	74424	
68	83375	81938	106643	156406	77914	83033	136467	171352	56743	60539	68083	64608	67719	76647	
70	85640	85236	110765	163954	79737	86097	142484	178346	58549	62592	69652	66219	70104	79383	
72	88653	88281	116016	171913	82248	89688	148032	183591	59997	64701	72255	68719	72601	81826	
74	90661	90666	120681	177626	83928	93269	154080	186750	62193	66530	74884	70974	74971	83966	
76	92835	94335	125196	181894	85967	96791	159012	188506	63605	68906	76783	73211	77156	87180	
78	95202	97088	129896	183374	88348	100316	163121	188841	65790	70606	78921	75319	79819	89826	
80	97436	100342	134204	*	90639	103141	164713	*	67319	73133	80751	78262	82525	92386	
82	100318	102900	138893	*	92543	107814	168477	*	69688	75816	83289	80372	85084	94623	
84	102380	106873	143282	*	94895	111228	169263	*	71170	78503	85504	82809	88069	98513	
86	104862	110604	147016	*	97206	115322	169923	*	73402	81161	87935	86102	90722	101158	
88	106727	114220	148423	*	99863	118732	170592	*	75274	83890	90476	88212	93250	103920	
90	110053	117025	151699	*	101361	123068	175223	*	77361	85958	92809	90440	96258	106711	
92	113091	120675	155570	*	104083	126755	176997	*	80668	88701	95158	93538	99231	109102	
94	115274	124414	154783	*	106212	130555	178781	*	82171	90748	97579	96568	102466	111988	
96	118524	127571	155070	*	109303	135093	179205	*	85771	93958	100590	98735	105206	115294	
98	120963	131994	158536	*	110623	139553	*	*	87452	96367	103717	102091	108489	118067	
100	123634	135164	162080	*	113320	143505	*	*	89433	99655	106589	104469	111910	120918	
102	126721	137814	164446	*	116117	147374	*	*	91919	102430	108950	107684	114836	124281	
104	129631	142053	166137	*	119248	150396	*	*	94488	105577	112033	110736	117852	127414	
106	131678	144423	*	*	120940	153959	*	*	96103	108466	115191	113609	120394	130315	
108	133983	146999	*	*	123544	157413	*	*	98614	112008	118078	116470	124179	133634	
110	136867	149462	*	*	125877	160027	*	*	100986	114604	121016	119110	127111	136680	
112	138960	149960	*	*	128424	162076	*	*	103262	117635	123692	121958	129826	139536	
114	140911	152345	*	*	130625	162738	*	*	106169	120874	126897	125918	133524	141901	
116	142792	153872	*	*	132295	165138	*	*	108371	123598	129509	128704	136419	145223	
118	144892	156370	*	*	134885	164962	*	*	111515	126810	133767	131679	139647	147298	

Legenda: *overflow

Priloga N: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po tretiranju s kvercetinom

čas merjenja (min)	normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD ₆₅₀)															
	kontrola				kultura 4 h tretirana s kvercetinom				kontrola				kultura 24 h tretirana s kvercetinom			
0	44656	22608	12121	9999	16967	15522	8220	7188	22509	23725	11607	11953	18410	16903	9476	8919
2	46002	22722	12668	10388	16841	15257	8199	7342	22389	23910	11817	12650	18246	16877	9519	9062
4	47395	23119	13443	10729	16810	15625	8204	7263	23192	24990	12254	13045	18458	16838	9601	9160
6	49506	23980	14364	11275	16732	15363	8368	7359	23650	25248	12733	13345	18487	17237	9670	9220
8	51529	24251	15326	11925	16888	15585	8490	7713	24117	26141	13098	13761	18616	17429	9785	9309
10	53966	24702	16614	12527	17404	15671	8825	7848	25061	27045	13662	14172	18891	17525	9890	9371
12	55477	25594	17745	13147	17220	15822	9181	7903	25511	27973	14173	14742	19163	17973	10057	9513
14	58302	26209	19020	13843	17727	16009	9432	8106	26226	28761	14757	15152	19147	18142	10354	9760
16	60519	27057	20515	14681	17769	16143	9676	8442	26882	29704	15263	15746	19726	18391	10542	9926
18	62523	27867	22118	15608	17808	16351	10144	8690	27540	30670	15987	16084	19821	18411	10634	9980
20	64379	28489	23847	16568	18133	16451	10445	9002	28317	31558	16495	16560	20013	18852	10876	10077
22	66213	29290	25497	17496	18339	16701	10972	9127	28890	32071	17319	17112	20319	19047	10941	10317
24	68418	30273	27763	18617	18379	16899	11265	9441	29958	33109	17956	17674	20473	19285	11209	10376
26	70706	30773	29566	19804	18749	17114	11811	9799	30557	33982	18855	18274	20861	19559	11529	10624
28	72494	31882	31837	20955	18814	17196	12237	10188	31530	35067	19725	18982	21391	19758	11628	10876
30	74543	32388	34131	22100	19076	17571	12700	10393	32498	36200	20490	19393	21469	19979	11953	10865
32	76758	33359	36594	23630	19376	17481	13229	10840	33621	37328	21301	20108	21845	20172	12038	11089
34	79187	34237	39487	25247	19664	17761	13840	11135	34460	38286	22228	20690	22124	20589	12323	11242
36	81337	35047	42265	26876	19819	18275	14505	11713	35571	39291	23384	21585	22507	20897	12559	11542
38	83433	36184	45209	28477	20024	18197	15211	12032	36721	40948	24608	22227	22607	21019	12871	11766
40	85581	37214	48143	30200	20541	18587	15779	12390	38308	42269	25619	22998	23216	21608	13110	11901
42	87862	38212	51936	32067	20920	18739	16555	12951	39624	43340	26980	23853	23507	21760	13467	12093
44	90189	39178	54965	33863	21090	19266	17172	13348	40924	45060	27997	24678	23922	22147	13576	12276
46	92318	40353	58600	36037	21308	18912	17853	13788	41997	46339	29482	25401	24165	22450	14020	12596
48	94837	41473	61920	38376	21560	19607	18601	14402	43479	47736	30850	26261	24769	22740	14247	12836
50	96545	42833	65594	40316	22120	19826	19412	14940	45193	49148	32098	27042	25041	23223	14605	13043
52	98918	43919	69618	42541	22499	19936	20224	15474	46719	50603	33381	28043	25563	23846	14812	13187
54	10202	45065	74134	44894	22809	20077	21219	15969	48577	52204	34971	29033	25824	24080	15431	13483
56	10417	46656	78053	47715	23241	20443	22048	16768	49951	53914	36701	30149	26233	24401	15508	13749
58	10708	47844	82489	49985	23613	20923	22892	17137	51584	55263	38300	30974	26850	24633	16046	14140
60	10945	49252	86856	52638	24248	21170	23945	17624	53608	57160	39883	32263	27417	24974	16377	14395
62	11164	50439	91705	55353	24342	21405	25107	18592	55401	59099	41801	33180	27742	25430	16770	14610
64	11437	51907	96487	58630	24934	21504	25980	19229	56816	60757	43564	34466	28708	26143	17175	14827
66	11657	53625	10156	61218	25486	21880	27161	19782	58736	62427	45229	35474	29312	26446	17562	15275
68	11945	54548	10606	64333	25622	22085	28143	20573	60674	64741	47462	36639	29677	27044	18027	15541
70	12211	56602	11143	67115	26162	22495	29323	21190	62755	66525	49320	37688	29763	27490	18574	15827
72	12475	57766	11669	70628	26765	22762	30460	22169	64245	68373	51253	39053	30274	27864	18899	16122
74	12712	59416	12210	73335	27196	23318	31456	22832	66357	69889	53330	40151	31221	28298	19460	16536
76	12994	60889	12757	76645	27958	23717	32854	23474	68928	72799	55667	41542	31549	28734	19826	16829
78	13278	62640	13305	80042	28008	23736	33695	24344	70993	74138	58104	43127	32243	29206	20352	17285
80	13588	64365	13811	83252	28806	24523	35227	25178	73387	76216	60411	44420	32989	29633	20938	17501
82	13959	66077	14263	86576	29433	24648	36404	25935	75389	78574	62854	45913	33542	30125	21606	17949
84	14134	67697	14654	90162	29603	25011	37685	27171	77777	80856	65215	47198	33919	30697	21994	18297
86	14378	69617	14941	92121	30410	25639	39245	27723	80195	83073	68087	49112	35146	31526	22546	18739
88	14778	71623	15162	93926	30763	25918	40415	28532	83077	85808	70774	50695	35606	31878	23172	19391
90	15000	73578	15400	94905	31182	26331	41750	29430	86126	87586	73696	52243	36064	32195	23754	19466
92	15336	75229	*	95874	31972	26668	43088	30468	88389	90615	76406	54021	36696	32469	24510	19909
94	15595	77325	*	96369	32652	27275	44776	31757	91105	92349	79544	55486	37383	33365	25069	20382
96	15848	79480	*	96702	33190	27546	46184	32601	93783	95518	82447	57230	38014	33825	25602	20723
98	16105	81534	*	*	33831	28379	47360	33780	96945	98173	85318	58709	38952	34740	26309	21296
100	16312	83779	*	*	34496	28637	48988	34561	99790	10118	88809	60990	39890	35020	26860	21817
102	16614	85459	*	*	35392	28993	50293	35739	10244	10348	91857	62761	40406	35635	27649	22281
104	16884	87838	*	*	35790	29582	51978	36980	10613	10569	95001	64532	41243	36258	28496	22840
106	17169	89985	*	*	36795	30318	53464	37904	10930	10900	98334	66235	41894	37064	28946	23135
108	17347	92289	*	*	37451	30795	55325	38908	11266	11167	10151	68314	42907	37566	29681	23658
110	17535	94754	*	*	38000	31021	57012	39920	11617	11540	10510	70315	43707	38214	30380	24129
112	17657	96975	*	*	38840	31523	58870	41058	11943	11775	10866	72003	44110	38880	31301	24580
114	17775	99301	*	*	39716	32124	60714	42514	12284	12071	11259	73582	45233	39900	32079	25100
116	17982	10234	*	*	40514	32396	62554	43577	12709	12454	11590	76004	46339	40474	32947	25679
118	18118	10512	*	*	41482	33477	64144	44503	13053	12735	11937	78014	47229	41214	33699	26285

Legenda: *overflow

Priloga O: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po 4-urnem predtretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

čas merjenja (min)	normalizirana fluorescenčna intenziteta (FI/OD ₆₅₀)											
	kontrola				kultura tretirana z menadionom			kultura 4 h predtretirana z ask. kislino in izpostavljena menadionu		kultura 4h predtretirana s kvercetinom in izpostavljena menadionu		
	a	b	c	d	a	b	c	b	c	a	c	d
0	15482	18283	20688	28114	11443	15695	14690	17784	14098	7484	10918	11105
2	16878	19541	22126	29188	12327	16435	15462	18640	14436	7893	11195	11043
4	18441	20163	23527	30877	13124	17059	15881	19032	15190	8327	11417	11168
6	20015	21526	24570	32029	14234	18043	16880	20048	16240	8678	11742	11499
8	22093	22838	26023	33689	15352	19012	17859	20952	17134	9189	12208	11719
10	23783	23993	27555	35012	16730	19671	18754	22174	17730	9791	12291	12350
12	25684	25442	28812	36138	17907	20856	19361	23168	18869	10424	12395	12300
14	27706	26933	30318	38121	19282	21790	20823	23828	19847	10983	12724	12795
16	29873	28470	31951	39638	20581	23099	21542	25180	20667	11494	12922	13355
18	32179	30184	33619	40977	22305	24020	22749	26105	21589	12005	13384	13792
20	34634	31240	35249	42639	23899	25346	24082	27035	22904	12647	13682	14328
22	36969	32953	36857	44711	25586	27005	25045	28363	23909	13477	14249	14778
24	39145	34648	38501	46571	27329	28140	26257	29705	25124	14160	14718	15296
26	41871	36455	40314	48174	29048	29785	27358	31302	26303	14864	14833	15889
28	45006	38145	42051	49897	31077	31267	28544	32815	27739	15565	15571	16638
30	47518	39909	43847	51218	32825	32741	29923	34209	28879	16505	15874	17074
32	50617	42029	45661	52924	34929	34662	31723	35899	30592	17102	16228	17971
34	53339	44033	47883	55130	37478	37120	33379	37209	31943	18068	16820	18356
36	56817	45665	49616	56871	39744	38766	34875	38756	33648	19070	17589	18929
38	60599	48309	51825	58378	42421	40541	36723	40765	35157	20023	17968	19832
40	63711	50145	54307	60583	44864	42798	38160	42297	36856	21140	18578	20467
42	67064	52374	56468	62157	47682	44745	40346	44025	38660	22174	18968	21277
44	70667	54742	58339	63905	50082	47086	42033	45739	40561	23320	19507	22122
46	74069	56916	60664	66734	53209	49585	44244	47582	42038	24385	20278	22784
48	77780	59446	62903	68981	56342	52015	46559	49728	44027	25671	20502	23770
50	81930	61897	64974	70284	59222	54063	48517	51822	46184	26997	21318	24635
52	85463	64371	67808	73110	62856	56285	50643	53969	48336	28103	22012	25127
54	89918	66673	69978	75228	65998	59417	52754	56178	50195	29337	22584	26428
56	94010	68946	72328	77145	69753	62120	55450	57964	52234	30704	23588	27161
58	98056	71492	75321	79011	73208	65126	57551	60110	54890	32220	24183	28008
60	102932	74003	77260	81466	77034	67901	60314	62468	56772	33487	24977	29106
62	107312	76164	80078	84439	81459	71592	62630	64719	59375	35135	25742	30067
64	112663	79227	82937	86202	84788	74511	65614	67051	62118	36476	26510	31198
66	117641	81991	85084	88619	89206	77277	68037	69505	63979	38290	27347	31851
68	122157	84651	88410	90674	93225	81194	71538	71707	66910	39961	28025	32885
70	127957	87515	91296	93819	97500	84623	74265	73880	69395	41333	29069	33993
72	133437	90457	93921	96223	102174	88007	76971	76271	71298	43336	29846	35224
74	138329	92952	95983	99464	106792	91647	79858	78921	73686	45185	30759	36106
76	144381	96136	99852	101640	112046	94754	82515	81099	76865	47229	31500	37300
78	149692	99757	102982	102895	117263	98357	86190	84470	79187	48943	32492	38314
80	155521	101602	105615	106202	122976	102037	88922	87061	82195	51232	33160	39610
82	162063	104863	108121	109923	127783	105763	92500	89467	84852	52926	34334	40539
84	166674	107984	112337	111757	134089	109860	95915	92023	88395	54786	35164	42008
86	171235	111351	115057	114614	139567	114590	99283	94865	91259	57160	36197	43235
88	175381	114522	118295	117803	145088	117863	103008	97798	94603	58951	37360	44401
90	178834	117959	121701	120684	151203	121994	106766	101306	97388	61242	38432	45552
92	182109	121702	124890	123561	157927	126306	110213	103789	101173	63745	39456	46939
94	184689	124655	128107	126517	163536	130802	114079	106621	104049	65923	40462	48218
96	*	128563	131928	131021	169718	135305	117804	110559	107486	68282	41478	49539
98	*	132224	135857	133021	175765	141131	121931	113024	111151	70227	42473	51044
100	*	136051	139513	136327	181882	144229	125544	116417	114049	72806	43618	52288
102	*	140021	144208	139563	188536	149077	129743	119729	117810	75235	44577	53118
104	*	144155	147961	142739	193716	154353	134206	122238	121909	78114	45832	54634
106	*	149032	151741	145338	197692	158662	138203	126161	124956	80349	47010	55476
108	*	153189	156121	148697	200979	165114	142943	129648	128585	83083	48224	57373
110	*	157426	161160	152488	201068	169352	147776	134014	132639	85932	49583	58620
112	*	162226	165943	155129	204925	175898	152382	136841	137219	88341	50817	60065
114	*	166439	170804	157827	206751	180833	156670	141535	141762	90949	51889	61354
116	*	173004	175304	161916	*	186927	162078	144964	145300	93854	53465	62955
118	*	177247	180774	164512	*	192756	167184	148573	149833	96569	54976	64680

Legenda: *overflow

a, b, c, d – pripadajoče vrednosti za izračun relativnih fluorescenčnih intenzitet

Priloga P: Normalizirane fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po 24-urnem predtretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

čas merjenja (min)	normalizirana fluorescenčna intenziteta (F/OD ₆₉₀)																	
	kontrola						kultura tretirana z menadionom			kultura 24 h predtretirana z ask. kislino in izpostavljena menadionu			kultura 24 h predtretirana s kvercetinom in izpostavljena menadionu					
	a	b	c	d	e	f	c	d	e	c	d	f	a	b	c	d	e	f
0	8139	8787	15968	15769	16162	23661	14382	18880	15627	14976	15420	15384	5548	6003	9311	9486	9281	11045
2	8685	9470	17129	16824	16671	24441	15240	19184	16309	15508	15802	15996	5744	6255	9525	9774	9414	11142
4	9557	10230	17776	17868	17270	25297	15793	20378	17072	16192	16767	16989	5980	6306	9755	9651	9329	11329
6	10527	11235	18446	18576	17842	26705	16448	21113	18045	17096	17804	18369	6220	6497	9807	9958	9506	11648
8	11489	12358	19398	19248	19116	28195	17401	21918	19151	18477	18860	19503	6533	6835	9840	10303	9900	11869
10	12453	13474	20707	20373	20446	29374	18216	22945	20227	19057	19442	20982	6723	7144	9860	10023	9889	12195
12	13680	14693	21578	21440	21451	30749	19289	23925	21694	20213	20509	22061	7135	7446	10125	10345	10284	12659
14	14940	16095	22664	22265	22418	32403	19834	25182	23256	21255	21593	23745	7480	7850	10549	10428	10556	12958
16	16210	18114	23891	23589	23704	34284	20971	26231	24658	22277	22807	25287	7762	8272	10644	10571	10549	13419
18	17676	19644	25124	24529	24884	35763	21967	27294	26293	23771	24443	27292	8343	8708	10777	10681	11231	13885
20	19191	21609	26407	25403	26704	37683	23244	28375	28480	24915	25752	29660	8739	9217	10940	11161	11569	13995
22	20730	23417	27416	26125	27787	39233	24298	29741	30366	26310	26880	31192	9219	9800	11313	11420	11818	14639
24	22205	25192	28549	27939	29371	40836	25503	31306	32504	27921	28290	33714	9675	10397	11514	11702	12281	14964
26	23957	27441	29529	28703	31098	43095	26878	32933	34820	29407	29831	35894	10153	10930	11679	11600	12671	15361
28	25572	29576	31152	30014	32337	44706	28294	34211	37204	30789	31243	38051	10707	11552	12068	12155	12940	16127
30	27575	32284	32692	31259	34071	47097	30254	35895	39673	32462	33153	40782	11171	12137	12382	12458	13412	16488
32	29351	35087	34146	32514	35657	48935	31266	37723	42452	34151	34775	43728	11904	12755	12756	12421	14052	17008
34	31374	37596	35685	33649	38237	50822	32761	39382	45050	36086	36401	46116	12546	13434	13026	12813	14564	17645
36	33685	40451	36943	35266	40332	53259	34671	41076	48128	37507	38550	48657	12954	14199	13151	13124	14890	18139
38	35918	43234	38616	36555	42283	54740	36246	42904	51559	39636	40282	52139	13690	14784	13629	13413	15629	18846
40	37858	46814	40430	38052	44384	57476	37856	44663	54785	41017	42506	55255	14501	15828	14129	13682	15992	19554
42	40225	49854	41548	39772	47435	60189	40167	47455	58214	43037	44385	58440	15297	16521	14448	14100	16422	20315
44	42744	53356	43969	41433	49460	62410	42222	49260	62260	45093	46587	62401	15965	17502	14855	14695	17302	20989
46	45338	56908	45536	43079	51606	64819	43967	51177	65714	47567	48573	65421	16813	18198	15385	14904	17868	21305
48	48196	60920	47181	45119	54449	68025	46164	53559	69770	49353	50803	69293	17604	19269	15556	15160	18545	22373
50	50643	64746	49344	46437	56445	70571	48718	55829	74097	51961	53243	73211	18433	20147	16150	15628	19605	22958
52	53315	68816	51412	48768	59316	73692	50391	57904	77444	53488	56064	76681	19541	21108	16422	16043	20048	23790
54	56434	72944	53245	50295	62565	77183	53068	60840	81951	55849	58278	81364	20263	22250	16737	16480	20826	24648
56	59769	78013	55827	52653	65824	79487	55298	63097	87055	58231	60920	85137	21379	23113	17405	16760	21569	25253
58	63073	82576	58007	54066	69837	82802	58067	65536	91324	61174	63500	89384	22414	24463	17615	17164	22458	26142
60	66271	88288	59932	55865	72185	86222	60754	67912	96161	62964	65935	93792	23479	25701	17906	17430	23354	26882
62	69775	92897	62608	58061	75522	89424	63118	71018	101413	66267	68867	98894	24624	26953	18628	17958	24269	27629
64	73648	98954	64820	60325	79548	93284	65945	73671	105820	68249	71361	103057	25822	28068	19045	18273	25055	28583
66	77352	104881	67276	62257	83308	97050	69182	76474	110619	70986	74617	107478	26797	29680	19819	18638	25933	29368
68	81226	110712	69418	64184	87058	100673	72306	79265	116397	74512	77853	112546	28294	30891	20175	19421	26845	30805
70	84858	116831	71778	66740	90746	104333	75097	82370	121150	77413	80556	117312	29420	32436	20994	19691	27551	31217
72	88656	122847	74228	69269	94787	107898	78110	85392	127451	79623	83107	123640	30926	34274	21399	20204	28601	32333
74	92861	129728	77143	71740	98788	111691	81354	88273	132681	82832	86543	128042	32180	35478	22120	20653	29460	33224
76	97141	136021	80442	74670	102607	115972	84363	91567	138318	85683	89576	133078	33540	36972	22723	21420	30490	34016
78	101979	142657	82985	77317	106815	120576	87863	94922	143780	88384	93266	138954	35193	38431	23336	21757	31493	34925
80	106429	149633	86077	79458	110964	123580	91596	98020	149470	92418	96968	143974	36626	39956	23845	22729	32257	35696
82	111745	157203	88622	82036	114912	127802	94317	101383	155756	95003	100009	150136	38309	41535	24545	23123	33189	36839
84	116303	163831	91702	85529	119851	131610	98271	104227	162456	98680	104161	155701	39819	43269	25213	23628	34287	38135
86	121478	169549	94843	87883	123835	136732	101976	109322	168461	101638	107846	162500	41702	44912	25933	24120	35395	38750
88	126787	174025	97934	90060	128837	140650	106110	111671	175567	105180	111669	167756	43348	46482	26495	24792	36465	39970
90	132187	177474	102025	93214	133097	144150	109316	115016	181949	108926	115077	174104	45183	48254	27048	25441	37594	40866
92	137242	183013	104274	96277	138120	148929	114477	119663	187145	112405	118914	179729	46978	50110	28102	25801	38607	41830
94	142185	188670	108442	99501	141762	152441	117693	123188	194645	115814	122973	186496	48949	52247	28711	26661	39637	43255
96	146214	193887	111875	102563	146743	157378	121487	127216	201607	120097	127557	192498	50744	54080	29719	27129	40948	44364
98	148935	196939	115691	105494	151694	161276	126209	130961	207815	123784	131329	199370	52950	56080	30055	27983	41943	45243
100	151999	*	119398	108851	156586	165801	129519	134844	212333	127657	135906	205413	55013	58133	30562	28666	42844	46057
102	154498	*	122475	112106	160927	170442	134199	138639	213857	131335	138745	209536	57104	59936	31607	29140	43847	47516
104	156394	*	126645	115656	165473	174671	138312	143213	214539	135102	144359	211836	59183	61591	31972	29834	44951	47867
106	158498	*	130059	117867	170447	178792	143987	146645	214991	139563	148822	212717	61224	63374	33077	30330	46037	49260
108	*	*	133114	121936	175007	183227	147759	151841	*	143814	152488	213006	63675	65641	33766	31035	47868	50521
110	*	*	137435	125570	179844	188159	153837	155974	*	147736	157810	*	66222	67424	34633	31971	48484	51435
112	*	*	141674	128126	184485	193279	158286	160147	*	152729	162925	*	68288	69783	35488	32591	50010	52732
114	*	*	146649	133009	190441	197662	163350	164973	*	156134	167714	*	70534	71800	36288	33281	50912	53803
116	*	*	152403	136998	194932	201700	168429	170419	*	161236	172824	*	72601	73586	37129	34171	52460	54797
118	*	*	155331	140982	199429	207018	174063	175638	*	166194	178164	*	75208	75776	38062	35106	53234	56618

Priloga Q: Vsebnost glutationa v reducirani obliki v biomasi kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

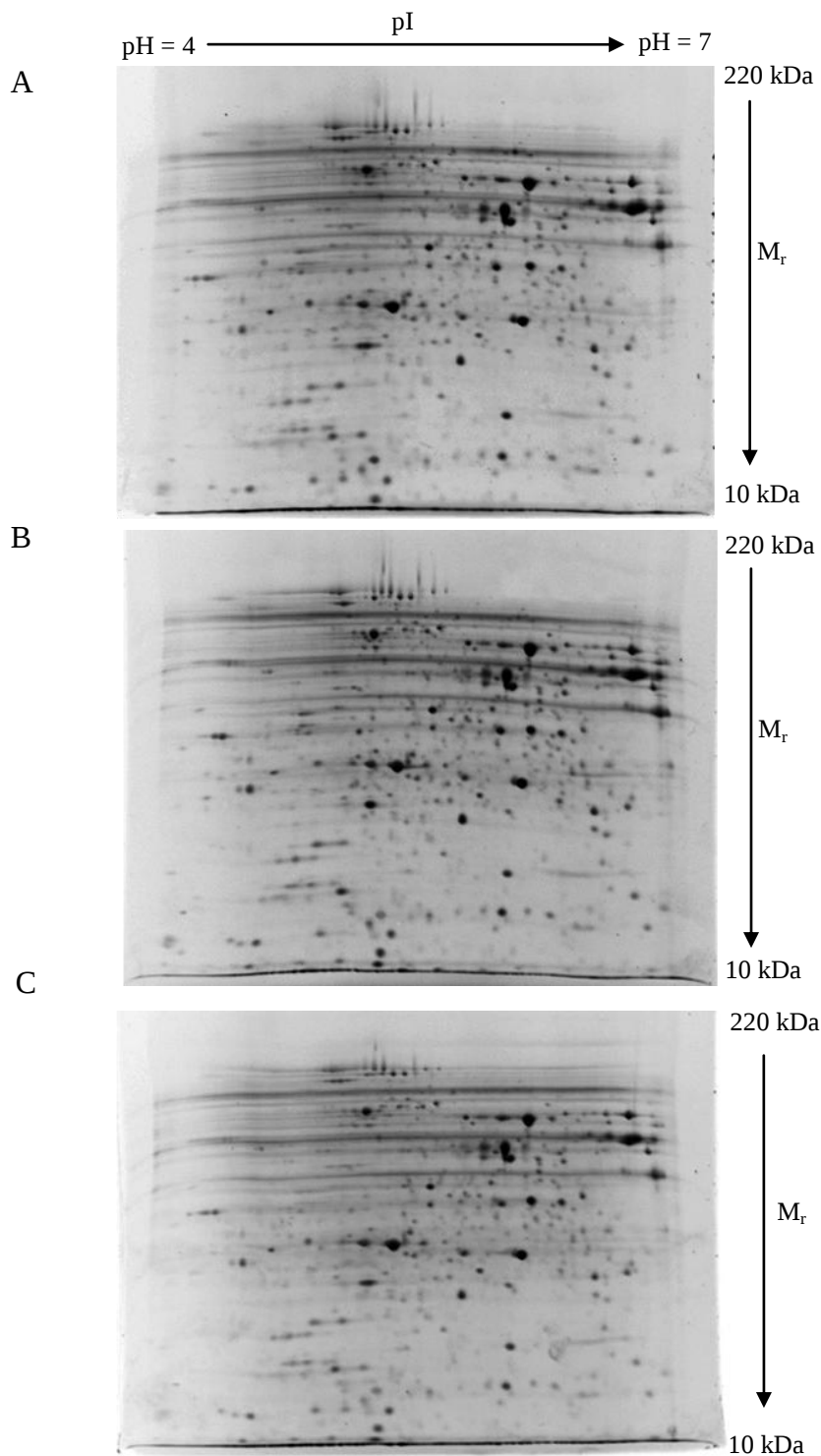
kultura		vsebnost reducirane oblike GSH (µg /µg skupnih proteinov)				
kultura 4 h tretirana z askorbinsko kislino	kontrola	0,00118	0,00115	0,00123	0,00132	
	AK	0,00117	0,00109	0,00142	0,00136	
kultura 4 h tretirana s kvercetinom	kontrola	0,00125	0,00141	0,00132		
	Q	0,00120	0,00113	0,00117		
kultura 24 h tretirana z askorbinsko kislino	kontrola	0,00106	0,00117	0,00117		
	AK	0,00075	0,00103	0,00093		
kultura 24 h tretirana s kvercetinom	kontrola	0,00105	0,00117	0,00141		
	Q	0,00111	0,00123	0,00146		
kultura 4 h predtretirana z ask. kislino in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	0,00180	0,00147	0,00135		
	M	0,00039	0,00034	0,00034		
	kontrola	0,00180	0,00147	0,00135		
	AK-M	0,00062	0,00050	0,00041		
kultura 4 h predtretirana s kvercetinom in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	0,00170	0,00160	0,00075	0,00099	0,00106
	M	0,00030	0,00030	0,00017	0,00031	0,00035
	kontrola	0,00082	0,00099	0,00091		
	Q-M	0,00033	0,00043	0,00037		
kultura 24 h predtretirana z ask. kislino in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	0,00184	0,00083	0,00098	0,00167	0,00127
	M	0,00055	0,00022	0,00027	0,00030	0,00027
	kontrola	0,00237	0,00184	0,00167	0,00127	
	AK-M	0,00050	0,00043	0,00042	0,00044	
kultura 24 h predtretirana z ask. kislino in/ali izpostavljena menadionu	kontrola	0,00170	0,00160	0,00075	0,00099	0,00106
	M	0,00055	0,00022	0,00027	0,00030	0,00027
	kontrola	0,00112	0,00082			
	Q-M	0,00051	0,00036			

Priloga R: Specifična aktivnost superoksid dismutaze v celičnem ekstraktu kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

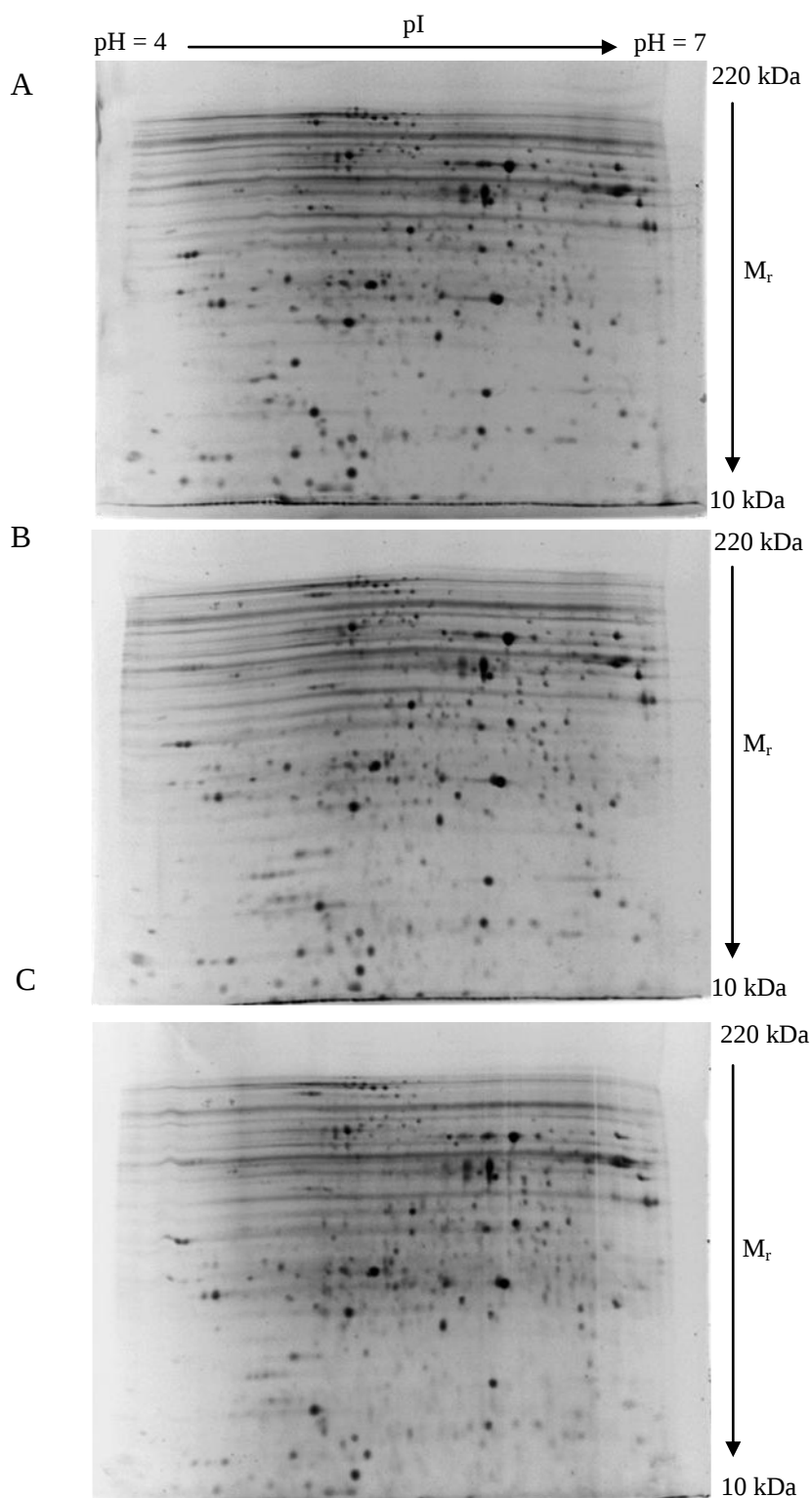
kultura		specifična aktivnost SOD (% inhibicije) / m _{proteinov}				
tretiranje z antioksidantom 4 h	kontrola	0,760	0,773	0,755		
	AK	0,876	0,839	0,900		
	kontrola	0,916	0,755	0,658	0,664	0,958
	Q	0,968	0,922	0,709	0,766	1,109
tretiranje z antioksidantom 24 h	kontrola	0,817	0,762			
	AK	1,056	1,140			
	kontrola	1,007	0,803	0,659	0,855	
	Q	1,131	0,871	0,805	0,889	
tretiranje z antioksidantom 4 h in/ali tretiranje z menadionom 2 h	kontrola	1,231	1,004	1,278	1,337	
	M	1,393	1,226	1,353	1,488	
	kontrola	0,897	1,085	0,655		
	AK-M	1,138	1,306	0,910		
	kontrola	1,004	1,278	1,044		
	Q-M	1,094	1,268	1,037		
tretiranje z antioksidantom 24 h in/ali tretiranje z menadionom 2 h	kontrola	0,876	1,127	0,741	0,974	
	M	1,035	1,384	0,998	1,149	
	kontrola	0,876	1,127	0,741		
	AK-M	1,229	1,374	0,881		
	kontrola	0,974	1,177	1,100		
	Q-M	1,006	1,242	1,118		

Priloga S: Specifična aktivnost proteasoma v celičnem ekstraktu kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 po (pred)tretiranju z askorbinsko kislino oz. kvercetinom in/ali izpostavitvi menadionu

kultura		specifična aktivnost proteasoma (Δ FI/ μ g prot./min)				
tretiranje z askorbinsko kislino 4 h	kontrola	187,0	199,8			
	40 mM AK	130,4	158,8			
	kontrola	277,7	187,0	199,8		
	80 mM AK	208,4	162,4	153,1		
tretiranje s kvercetinom 4 h	kontrola	277,7	187,0	199,8		
	0,2 mM Q	221,5	135,7	185,1		
	0,4 mM Q	137,9	106,3	136,0		
tretiranje z askorbinsko kislino 24 h	kontrola	216,0	193,3			
	40 mM AK	193,7	144,9			
	80 mM AK	132,9	127,0			
tretiranje s kvercetinom 24 h	kontrola	223,7	216,0	193,3		
	0,2 mM Q	136,1	196,3	141,5		
	0,4 mM Q	161,2	138,6	123,3		
tretiranje z askorbinsko kislino 4 h in/ali tretiranje z menadionom 2 h	kontrola	241,6	212,1			
	M	184,7	209,7			
	40 mM AK-M	203,7	201,3			
	80 mM AK-M	214,3	213,7			
tretiranje s kvercetinom 4 h in/ali tretiranje z menadionom 2 h	kontrola	254,4	256,8	212,1		
	M	239,4	225,4	209,7		
	kontrola	254,4	206,9	241,6	212,1	
	0,2 mM Q-M	212,8	163,0	206,7	175,2	
	kontrola	205,2	254,4	256,8	206,9	
	0,4 mM Q-M	132,7	153,7	132,9	118,0	
tretiranje z askorbinsko kislino 24 h in/ali tretiranje z menadionom 2 h	kontrola	178,2	197,4			
	M	181,1	184,9			
	40 mM AK-M	166,1	141,0			
	80 mM AK-M	125,5	151,3			
tretiranje s kvercetinom 24 h in/ali tretiranje z menadionom 2 h	kontrola	225,1	131,6	208,8	178,2	203,0
	M	204,5	151,5	219,7	181,1	200,8
	kontrola	225,1	222,4	197,4	230,6	203,0
	0,2 mM Q-M	144,9	165,0	178,1	186,9	160,2
	kontrola	225,1	222,4	208,8		
	0,4 mM Q-M	164,9	148,4	162,0		



Priloga T: Reprezentativni 2-D proteinski profili kulture kvasovke *S. cerevisiae*. (A) Proteinski profil kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti oziroma je bila predhodno tretirana 4 ure s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).



Priloga U: Reprezentativni 2-D proteinski profili kulture kvasovke *S. cerevisiae*. (A) Proteinski profil kulture, ki pred izpostavitvijo menadionu ni bila tretirana z antioksidanti oziroma je bila predhodno tretirana 24 ur s kvercetinom (B) ali askorbinsko kislino (C).