

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina SEMENIČ

**VPLIV ANTIOKSIDATIVNIH OBRAMBNIH
SISTEMOV KVASOVK PRI ODPORNOSTI NA
SELEN(VI)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina SEMENIČ

**VPLIV ANTIOKSIDATIVNIH OBRAMBNIH SISTEMOV KVASOVK
PRI ODPORNOSTI NA SELEN(VI)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEMS OF YEASTS
IN SELENIUM(VI) RESISTANCE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

POPRAVKI:

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

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

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Semenič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.22:582.282.23:546.23(043)=863
KG kvasovke/*Schizosaccharomyces pombe*/selen(VI)/antioksidativni obrambni sistemi/stres/oksidativni stres/toksičnost selena
AV SEMENIČ, Tina
SA RASPOR, Peter (mentor)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2006
IN VPLIV ANTIOKSIDATIVNIH OBRAMBNIH SISTEMOV KVASOVK PRI ODPORNOSTI NA SELEN(VI)
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XIV, 56 str., 3 pregl., 17 sl., 24 pril., 68 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Selen je v manjših koncentracijah esencialen kot mikroelement, večje koncentracije pa postanejo za organizem toksične. Ker naj bi med redukcijo selena(VI) nastajale reaktivne kisikove zvrsti (ROS), smo želeli preučiti vlogo antioksidativnih obrambnih sistemov kvasovk pri odpornosti na selen(VI). V ta namen smo uporabili dva seva kvasovke *Schizosaccharomyces pombe*, in sicer ZIM 1889, na selen(VI) odporni sev (Se^R), ki ima neaktiven encim ATP-sulfurilaza, in ZIM 1878, na selen(VI) občutljivi sev (Se^S) z aktivno ATP-sulfurilazo. Z dodajanjem 0,04 mM, 0,4 mM ter 4 mM koncentracije selena(VI) na začetku aerobne kultivacije, smo želeli ugotoviti vpliv selena(VI) na rast, kondicijo celic, znotrajcelično oksidacijo ter na antioksidativne obrambne sisteme obeh sevov. Selen(VI) ima inhibitorni učinek na rast, posledično se zmanjša tudi skupno število celic, število kolonijskih enot in relativna živost pri sevu ZIM 1878 (Se^S), medtem ko pri sevu ZIM 1889 (Se^R) ne pride do sprememb. Z oceno znotrajcelične oksidacije smo ugotovili, da dodatek selena(VI) v gojišče pri na selen(VI) občutljivemu sevu povzroči povečano znotrajcelično oksidacijo, medtem ko je pri sevu ZIM 1889 (Se^R) znotrajcelična oksidacija nespremenjena. Med encimi antioksidativnega obrambnega sistema smo določali aktivnosti katalaze (CAT), Mn-vsebujoče superoksid-dismutaze (MnSOD), Cu,ZnSOD, glutation-peroksidaze (GPX), glutation-reduktaze (GR) in glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PDH). Kot posledica oksidativnega stresa je prišlo do povečanja aktivnosti pri vseh treh dodanih koncentracijah selena(VI) v gojišču pri sevu ZIM 1878 (Se^S) pri encimih MnSOD, CAT, GPX in GR, medtem ko do povišane aktivnosti encima Cu,ZnSOD ni prišlo. Povečana aktivnost encima G6PDH v primerjavi s kontrolo je bila le pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču. Pri sevu ZIM 1889 (Se^R) dodatek selena(VI) ni povzročil sprememb encimskih aktivnosti. Ugotovili smo tudi, da je selen(VI) povzročil zmanjšanje znotrajcelične vsebnosti reduciranega glutationa (GSH) v odvisnosti od večanja koncentracije dodanega selena(VI) pri na selen(VI) občutljivem sevu. Pri na selen(VI) odpornem sevu do razlik v vsebnosti GSH ni prišlo. Aktivnost encima ATP-sulfurilaze je za redukcijo selena(VI) zelo pomembna, saj povzroči aktivacijo selena(VI) in tako je omogočena nadaljnja redukcija. Zaradi nastanka ROS med redukcijo selena(VI) in oksidativnega stresa pride do indukcije antioksidativnih obrambnih sistemov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22:582.282.23:546.23(043)=863
CX yeasts/*Schizosaccharomyces pombe*/selenium(VI)/antioxidative defence systems/stress/oxidative stress/selenium toxicity
AU SEMENIČ, Tina
AA RASPOR, Peter (supervisor)/CIGIČ, Blaž (reviewer)
PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI THE EFFECT OF ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEMS OF YEASTS IN SELENIUM(VI) RESISTANCE
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 56 p., 3 tab., 17 fig., 24 ann., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Selenium is essential as a trace element at low concentrations, but becomes toxic for the organism at higher concentrations. Since it is believed that reactive oxygen species (ROS) are formed during the selenium(VI) reduction, the effect of antioxidative defence systems of yeasts in selenium(VI) resistance was studied. For this purpose two strains of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, ZIM 1889, selenium(VI) resistant (Se^R), and ZIM 1878, selenium(VI) sensitive (Se^S) strain with inactive and active ATP-sulfurylase, respectively, were used. By adding 0,04 mM, 0,4 mM and 4 mM concentrations of selenium(VI) at the start of the aerobic batch cultivations the influence of selenium(VI) on the growth, cell condition, intracellular oxidation and antioxidative defence systems was studied. Selenium(VI) has inhibitory effect on growth of yeast strain ZIM 1878 (Se^S), consequently the total cell number, number of colony forming units and relative cultivability have decreased. There are no effects on the yeast strain ZIM 1889 (Se^R). By estimation of intracellular oxidation it was established that selenium(VI) increased intracellular oxidation in selenium(VI) sensitive strain, but has no effect on intracellular oxidation of yeast strain ZIM 1889 (Se^R). Among enzymes of the antioxidant defence system activity of catalase (CAT), Mn-containing superoxide dismutase (MnSOD), Cu,ZnSOD, glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were measured. As a consequence of an oxidative stress the activity of MnSOD, CAT, GPX and GR of the strain ZIM 1878 (Se^S) increased in all three concentrations of the selenium(VI) added into the media, while Cu,ZnSOD activity did not change. Activity of G6PDH increased only when 0,04 mM concentration of selenium(VI) was added into the media. Selenium(VI) did not change the enzymatic activity of the yeast strain ZIM 1889 (Se^R). Selenium(VI) decreased intracellular content of reduced glutathione (GSH) due to higher concentrations of selenium(VI) within the media of the selenium(VI) sensitive (Se^S) yeast strain, but has no effect on GSH content of the selenium(VI) resistant yeast strain. The results demonstrated importance of ATP-sulfurylase activity for the selenium(VI) reduction, since selenium(VI) activation and further selenium(VI) reduction is enabled. Because of ROS formation during selenium(VI) reduction and oxidative stress antioxidative defence systems are induced.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKAVE IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SELEN.....	3
2.1.1 Vloga selena.....	3
2.1.2 Protirakavo delovanje selena.....	4
2.2 METABOLIZEM SELENA(VI) PRI KVASOVKAH	4
2.3 TOKSIČNOST SELENA	7
2.3.1 Odpornost na selen	7
2.4 OKSIDATIVNI STRES	8
2.4.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	9
2.4.1.1 Superoksidni anion	9
2.4.1.2 Vodikov peroksid	9
2.4.1.3 Hidroksilni radikal.....	10
2.5 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI.....	11
2.5.1 Encimski antioksidativni obrambni sistemi.....	12
2.5.1.1 Superoksid-dismutaza.....	12
2.5.1.2 Katalaza	13
2.5.1.3 Glutation-peroksidaza.....	13
2.5.1.4 Glutation-reduktaza	13
2.5.1.5 Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza	13
2.5.2 Neencimski antioksidativni obrambni sistemi	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 POTEK DELA.....	15
3.2 MATERIALI	16
3.2.1 Kvasovka <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.....	16
3.2.2 Gojišča	16
3.2.3 Reagenti in raztopine	17
3.2.4 Oprema	19
3.3 METODE	21

3.3.1	Aerobne kulture z enkratnim polnjenjem	21
3.3.2	Določanje kulture kvasovk in skupnega števila celic	21
3.3.3	Ocena znotrajcelične oksidacije	22
3.3.4	Priprava celičnega ekstrakta	23
3.3.5	Določevanje topnih proteinov v celičnem ekstraktu	23
3.3.6	Določevanje encimskih aktivnosti antioksidativnih obrambnih sistemov	24
3.3.6.1	Katalaza	25
3.3.6.2	Glutation-reduktaza	25
3.3.6.3	Glutation-peroksidaza	26
3.3.6.4	Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza	26
3.3.6.5	Superoksid-dismutaza	26
3.3.7	Določevanje vsebnosti glutaciona v reducirani obliki	27
3.3.8	Statistična obdelava podatkov	28
4	REZULTATI	30
4.1	VPLIV SELENA(VI) NA RAST, KONDICIJO IN ZNOTRAJCELICNO OKSIDACIJO CELIC KVASOVKE <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	31
4.1.1	Vpliv selena(VI) na rast	31
4.1.2	Vpliv selena(VI) na kondicijo celic	33
4.1.3	Vpliv selena(VI) na znotrajcelično oksidacijo	35
4.2	VPLIV SELENA(VI) NA ANTIOKSIDATIVNE OBRAMBE SISTEME KVASOVKE <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	36
4.2.1	Vpliv selena(VI) na aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema	36
4.2.1.1	Aktivnost superoksid-dismutaz	36
4.2.1.2	Aktivnost katalaze	38
4.2.1.3	Glutation-peroksidaza, glutacion-reduktaza in glukoza-6-fosfat- dehidrogenaza	39
4.2.2	Vpliv selena(VI) na vsebnost glutaciona v reducirani obliki	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	RAZPRAVA	42
5.1.1	Vpliv selena(VI) na rast, kondicijo celic in oceno znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	42
5.1.1.1	Na selen(VI) odporni sev kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1889 (Se ^R)	42
5.1.1.2	Na selen(VI) občutljivi sev kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1878 (Se ^S)	43
5.1.2	Vpliv selena(VI) na antioksidativne obrambne sisteme kvasovke <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	45
5.2	SKLEPI	50
6	POVZETEK	51
7	VIRI	52

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primarni in sekundarni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in Costa, 2000)	11
Preglednica 2: Sestava YEPD-agarja in YEPD-bujona (Raspor in Smole-Možina, 1993). 16	
Preglednica 3: Vpliv selena(VI) na učinkovitost encimov antioksidativnega obrambnega sistema in vsebnost glutaciona v reducirani obliki pri kvasovki <i>S. pombe</i> seva ZIM 1889 (Se ^R) ter ZIM 1878 (Se ^S); rezultati so podani kot povprečna vrednost meritev dveh neodvisnih gojitev ± SD.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Metabolizem selena(VI) po asimilacijski poti sulfata pri kvasovkah (prirejeno po Mendoza-Cózatl in sod., 2005).....	5
Slika 2: Encimska redukcija selena(VI) po poti sulfata in neencimska redukcija APSe pri kvasovkah (Dilworth in Bandurski, 1977).....	6
Slika 3: Poenostavljen pregled antioksidativnega obrambnega sistema (Nordberg in Arner, 2001).....	12
Slika 4: Hodogram poskusa.....	15
Slika 5: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na rast kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1889 (Se ^R) v stresani kulturi (YEPD gojišče, t = 34 h, T = 28 °C, 200 vrt./min); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev dveh neodvisnih gojitev, KV je podan v Prilogi C1-C4. Opombe črtnega grafikona: kontrola -■-, 0,04 mM -▲-, 0,4 mM -○-, 4 mM -□-.....	31
Slika 6: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na rast kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1878 (Se ^S) v stresani kulturi (YEPD gojišče, t = 34 h, T = 28 °C, 200 vrt./min); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev dveh neodvisnih gojitev, KV je podan v Prilogi C1-C4. Opombe črtnega grafikona: kontrola -■-, 0,04 mM -▲-, 0,4 mM -○-, 4 mM -□-.....	31
Slika 7: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na kondicijo celic stresane kulture (YEPD gojišče, T = 28 °C, 200 vrt./min) kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1889 (Se ^R) v sredini eksponentne faze rasti; (skupno število celic (stolpčni grafikon, ▨), število kolonijskih enot (KE) (stolpčni grafikon, ▩) in relativno živost kvasovke (črtni grafikon, -■-)); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001.....	33
Slika 8: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na kondicijo celic stresane kulture (YEPD gojišče, T = 28 °C, 200 vrt./min) kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1878 (Se ^S) v sredini eksponentne faze rasti; (skupno število celic (stolpčni grafikon, ▨), število kolonijskih enot (KE) (stolpčni grafikon, ▩) in relativno živost kvasovke (črtni grafikon, -■-)); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001.....	34
Slika 9: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na relativno intenziteto fluorescence (RFE) izražene v odstotkih stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke <i>S. pombe</i> ZIM 1889 (Se ^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se ^S) (stolpčni grafikon, ▢) v sredini eksponentne faze rasti; rezultati so podani kot povprečje šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001.....	35

- Slika 10: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično celokupno aktivnost encima superoksid-dismutaza (SOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev 36
- Slika 11: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično aktivnost encima Mn-vsebujoče superoksid-dismutaze (MnSOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001 37
- Slika 12: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično aktivnost encima Cu,Zn vsebujoče superoksid-dismutaze (Cu,ZnSOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev 37
- Slika 13: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično aktivnost encima katalaze (CAT) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001 38
- Slika 14: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično aktivnost encima glutation-peroksidaza (GPX) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: ■ - p < 0,01, * - p < 0,001 38
- Slika 15: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično aktivnost encima glutation-reduktaza (GR) v celičnem ekstraktu stresane kulture kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001 39

Slika 16: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na specifično aktivnost encima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001 40

Slika 17: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04 mM, 0,4 mM, 4 mM) na vsebnost glutationa v reducirani obliki pri stresani kulturi (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovki *S. pombe* sev ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost osmih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001 41

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu; maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA
- Priloga B1: Umeritvena krivulja za določevanje števila celic/ml (št. celic/ml v odvisnosti od OD₆₅₀)
- Priloga C1: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) brez dodanega selena(VI) (kontrola)
- Priloga C2: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) z 0,04 mM koncentracijo selena(VI)
- Priloga C3: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) z 0,4 mM koncentracijo selena(VI)
- Priloga C4: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) s 4 mM koncentracijo selena(VI)
- Priloga C5: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S) brez dodanega selena(VI) (kontrola)
- Priloga C6: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S) z 0,04 mM koncentracijo selena(VI)
- Priloga C7: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S) z 0,4 mM koncentracijo selena(VI)
- Priloga C8: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S) s 4 mM koncentracijo selena(VI)
- Priloga D1: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) za določevanje skupnega števila celic v sredini eksponentne faze
- Priloga D2: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1878 (Se^S) za določevanje skupnega števila celic v sredini eksponentne faze

Priloga D3: Število kolonij kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) v sredini eksponentne faze inkubirane na YEPD-agarju (T = 28 °C, t = 3 dni)

Priloga D4: Število kolonij kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponentne faze inkubirane na YEPD-agarju (T = 28 °C, t = 3 dni).

Priloga E1: Povprečje števila celic ter merjenje intenzitete fluorescence (RFE) za določevanje ocene znotrajcelične oksidacije stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponentne faze; rezultati so podani tudi v %, kjer velja, da ima kontrolni vzorec vrednost 100 %

Priloga F1: Merjenje absorbance ($\lambda = 595$ nm, 10-kratne redčitve, V = 50 μ L) in določitev vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih (V = 50 μ L) stresane kulture (YEPD gojišče, T = 28 °C, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) v sredini eksponentne faze rasti

Priloga F2: Merjenje absorbance ($\lambda = 595$ nm, 10-kratne redčitve, V = 50 μ L) in določitev vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih (V = 50 μ L) stresane kulture (YEPD gojišče, T = 28 °C, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponentne faze rasti

Priloga F3: Sprememba absorbance ($\lambda = 550$ nm) v treh minutah ($\Delta A_{550}/3$ min) merjena pri celokupni aktivnosti encima superoksid-dismutaza (SOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

Priloga F4: Sprememba absorbance ($\lambda = 550$ nm) v treh minutah ($\Delta A_{550}/3$ min) merjena pri encimu Mn-vsebujoča superoksid-dismutaza (MnSOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

Priloga F5: Sprememba absorbance ($\lambda = 240$ nm) na minuto ($\Delta A_{240}/\text{min}$) merjena pri encimu katalaza (CAT) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

Priloga F6: Sprememba absorbance ($\lambda = 340$ nm) na minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$) merjena pri encimu glutathion-peroksidaza (GPX) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) in ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

Priloga F7: Sprememba absorbance ($\lambda = 340$ nm) na minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$) merjena pri encimu glutathion-reduktaza (GR) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

Priloga F8: Sprememba absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) na minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$) merjena pri encimu glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

Priloga F9: Merjenje absorbance ($\lambda = 412 \text{ nm}$) pri določevanju vsebnosti glutaciona v reducirani obliki (GSH) stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP	adenozindifosfat
APSe	adenozinfosfoselenat
ATP	adenozintrifosfat
CAT	katalaza
CCP	citokrom-C-peroksidaza
Cu,ZnSOD	citoplazemska, Cu in Zn vsebujoča superoksid-dismutaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ϵ	molarni ekstincijski koeficient
EDTA	etilendiaminotetraacetat
G6PDH	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
GPX	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSH	glutation (reducirana oblika)
GSSG	glutation (oksidirana oblika)
H ₂ DCF	dihidro-2,7-diklorofluorescein
H ₂ DCFDA	dihidro-2,7-diklorofluorescein acetat
KE	kolonijske enote (angl. CFU, <u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits)
KV	koeficient variabilnosti
λ	valovna dolžina
MnSOD	mitondrijska, Mn vsebujoča superoksid-dismutaza
NAD ⁺	nikotinamadeninukleotid
NADP ⁺	nikotinamadeninukleotidfosfat (oksidirana oblika)
NADPH	nikotinamadeninukleotidfosfat (reducirana oblika)
NBT	NitroBlueTetrazolium
OD ₆₅₀	optična gostota; intenziteta prepuščene svetlobe pri $\lambda = 650$ nm
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies)
SD	standardni odklon
Se ^R	odpornost na selen
Se ^S	občutljivost na selen
SOD	superoksid-dismutaza
U	encimska enota (angl. <u>U</u> nits)
vrt./min	vrtljaji na minuto
YEPD	gojišče kvasni ekstrakt-pepton-glukoza
w/v	masa/volumen
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

Oksidativni stres, nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in antioksidativni obrambni sistemi so povezani v teorijo prostih radikalov, ki razlaga celično staranje. Dolgo življenje pri ljudeh naj bi bilo odvisno od učinkovitosti antioksidativnih obrambnih sistemov, ki preprečujejo nastanek večjega obsega poškodb makromolekul. Še posebej izpostavljene so poškodbe DNA, ki imajo za celico mnoge različne posledice, med katerimi je tudi nastanek rakavih obolenj. Znano je tudi, da lahko tako kovine kot tudi prehodne kovine (železo, baker, cink, krom ...) povzročijo oksidativni stres v celicah predvsem zaradi nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) med izpostavitvijo celic elementom. Preživetje celic med oksidativnim stresom je odvisno od zaznavanja in prilagajanja na stresne razmere ter odstranjevanja ROS in morebitnih nastalih poškodb. Med mehanizmi antioksidativnih obrambnih sistemov je pomembno delovanje primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov, ki poskušajo odstraniti čim večjo količino nastalih ROS ter tako preprečiti nastanek morebitnih poškodb v celicah (Stohs in Bagchi, 1994; Jakubowski in sod., 2000; Matés in Sánchez-Jiménez, 2000; Wickens, 2001).

Selen je esencialen mikroelement, ki ima tako pri sesalcih kot pri mikroorganizmih različne učinke v odvisnosti od koncentracije. V majhnih koncentracijah ima mnoge ugodne učinke na zdravje ljudi, med njimi je največ pozornosti raziskovanj usmerjenih v protirakavo delovanje selena, kjer je poznanih več mehanizmov predvidenega protirakavega delovanja selena. Prav tako je kot del aminokislina selenocistein pomemben sestavni del selenoproteinov. Vendar večje koncentracije selena postanejo toksične in mutagene, mehanizem delovanja pa še ni docela raziskan. Z boljšim poznavanjem vpliva selena na oksidativni stres in vlogo antioksidativnih obrambnih sistemov pa lahko pripomoremo k boljšemu razumevanju vloge selena v preprečevanju mnogih bolezni (Rayman, 2000; Bébien in sod., 2002).

Ker metabolizem kvasne celice lahko primerjamo z metabolizmom in določenimi funkcijami višjih organizmov, so se kvasovke izkazale kot dober modelni organizem (Yanagida, 2002). Zato smo v eksperimentalnem delu kot modelni organizem za preučevanje selena na oksidativni stres ter antioksidativne obrambne mehanizme uporabili kvasovko vrste *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), kjer smo uporabili dva različna seva, in sicer na selen(VI) odporni in na selen(VI) občutljivi sev kvasovke *S. pombe*.

1.1 CILJI RAZISKAVE IN DELOVNA HIPOTEZA

Predvideva se, da je selen(VI) za kvasovke toksičen le, če pride do redukcije do selena(IV), kjer naj bi prišlo do tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003). Za redukcijo selena(VI) pa je potrebna nepoškodovana asimilacijska transportna pot sulfata, po kateri poteče tudi redukcija selena(VI). Ker tvorba ROS povzroči oksidativni stres, naj bi prišlo do povečane aktivnosti mehanizmov za odstranjevanje ROS, med njimi tudi encimov antioksidativnega obrambnega sistema.

Zato je bil cilj raziskave izpostaviti na selen(VI) odporni in na selen(VI) občutljivi sev kvasovke vrste *Schizosaccharomyces pombe* različnim koncentracijam dodanega selena(VI) v gojišču ter ugotoviti vlogo antioksidativnih obrambnih sistemov pri odpornosti na selen(VI).

Delovna hipoteza:

Predvidevamo, da je toksičnost selena(VI) povezana s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki naj bi nastajali med redukcijskimi procesi selena(VI). Nastanek ROS posledično inducira antioksidativne obrambne sisteme kvasovk in tako posredno vpliva na odpornost kvasovk na selen(VI).

2 PREGLED OBJAV

2.1 SELEN

Element selen je odkril švedski kemik Jons Jacob Berzelius leta 1817 med analiziranjem rdečega depozita na svinčenih stenah komor, uporabljenih pri pridobivanju žveplove kisline (Tinggi, 2003). Selen ima lastnosti tako kovin kot nekovin, zato spada med metaloide in je uvrščen v šesto skupino periodnega sistema. Nahaja se v več oksidacijskih stanjih, in sicer Se^{2-} (selenid), Se^0 (elementarni selen), Se^{4+} (selenit ali selen(IV)) in Se^{6+} (selenat ali selen(VI)) (Combs, 1993).

Nekatere kemijske lastnosti (atomska masa, ionizacijski potencial, vezavna energija, elektronegativnost) selena so podobne žveplu, vendar se v bioloških sistemih razlikujeta. Selenove spojine stremijo k reduciranemu stanju, žveplove pa k bolj oksidiranemu stanju. Razlika med njima nastane tudi pri fiziološkem pH, kjer je selenohidrilna (-SeH) skupina aminokisline selenocistein v disociiranem stanju, sulfidrilna (-SH) skupina aminokisline cistein pa v protoniranem stanju (Combs, 1993).

2.1.1 Vloga selena

Esencialnost selena je bila odkrita že leta 1957, ko sta Schwarz in Foltz (1958) potrdila zaščitno vlogo selenofaktorja (faktor 3) pred nekrozo jeter pri sesalcih s pomanjkanjem vitamina E. Da je encim antioksidativnega obrambnega sistema glutation-peroksidaza (GPX) selenoprotein, kjer vsaka od štirih podenot v aktivnih mestih vsebuje en atom selena, pa je bilo ugotovljeno leta 1973 (Tinggi, 2003). Selen se nahaja tudi v encimu tioredoksin-reduktaza kot aminokislina selenocistein. Skladiščenje presežnega dela selena v celici poteka v obliki elementarnega selena v vakuolah ali pa se uporabi v biosintezi aminokislin, ki vsebujejo selen (selenometionin, selenocistein). Prisotnost elementarnega selena v celici je opazna po rdečem obarvanju, ki je značilno za redukcijo selena(IV) do elementarnega selena (Gharieb in sod., 1995; Pinson in sod., 2000).

Pri človeku je selen potreben za pravilno delovanje imunskega sistema, inhibira razvoj HIV v AIDS, potreben je za gibanje spermijev, povezujejo pa ga tudi z zmanjšanjem možnosti splavov pri nosečnicah. Pomanjkanje selena je prav tako povezano z boleznimi srca in ožilja, povečan vnos selena pa naj bi zmanjševal nastanek rakavih obolenj. Vnos selena pri človeku je povezan s preskrbljenostjo selena v tleh, zato prihaja na geografskih področjih z nizko vsebnostjo selena, kot je npr. Kitajska, do boleznih povečanih sklepov (Kashin-Beckova bolezen) ter kardiomiopatij (Keshanova bolezen) (Levander, 1986; Foster in Sumar, 1997; Rayman, 2000).

2.1.2 Protirakavo delovanje selena

Znano je, da je povečana vsebnost selena v krvni plazmi povezana z zmanjševanjem nastanka rakavih obolenj kot tudi z večjim odstotkom preživelih pri nekaterih tipih raka pri človeku (Rayman, 2000). Zaradi povezave med vsebnostjo selena v krvi, sposobnostjo reagiranja selenita s proteini, ki vsebujejo tiolne skupine, ter izsledki raziskav o toksičnosti selena(IV) je Lipinski (2005) predlagal hipotetično razlago zdravljenja bolezniraka s selenom(IV).

Tiolne skupine proteinov, ki se nahajajo na membrani rakavih celic, lahko reagirajo s proteini plazme, kot je fibrinogen, ter tvorijo fibrinu podobne polimere. Le-ti so netopni in na proteazno aktivnost neobčutljivi, za rakave celice pa predstavljajo zaščitni plašč, pod katerim so tumorski antigeni za imunski sistem nedosegljivi. Tako so rakavo spremenjene celice zaščitene pred celicami naravnih ubijalk. Selen(IV) lahko oksidira tiolne skupine membranskih proteinov rakavih celic in s tem prepreči nastanek plašča. Posledično so rakave celice izpostavljene celicam imunskega sistema, kar omogoči prepoznavo in uničenje rakavih celic. Poleg oksidacije tiolnih skupin selen(IV) povzroči tudi aktivacijo celic naravnih ubijalk z do sedaj še neznanim mehanizmom (Lipinski, 2005).

Vendar to ni edina hipoteza o protirakavem delovanju selena, dodatno težavo pa predstavljajo tudi nasprotujoči si rezultati med podobnimi raziskavami. Selen je pomemben v protirakavem delovanju tudi zato, ker se nahaja v aktivnem mestu glutationperoksidaze (GPX), ki je encim antioksidativnega obrambnega sistema, znano pa je, da GPX odstranjuje vodikov peroksid in lipidne hidroperokside, ki lahko poškodujejo DNA. Poškodbe DNA vodijo v mutacije, ki so lahko vzrok rakavih obolenj (Combs in Gray, 1998).

Protirakavo delovanje selena je povezano tudi z inhibicijo podvojevanja DNA, RNA in proteinske sinteze. Tako naj bi inhibicija sinteze proteinskih kinaz, ki so odgovorne za regulacijo celične rasti, napredovanje tumorjev in diferenciacijo, imela protirakave učinke (El-Bayoumy, 2001).

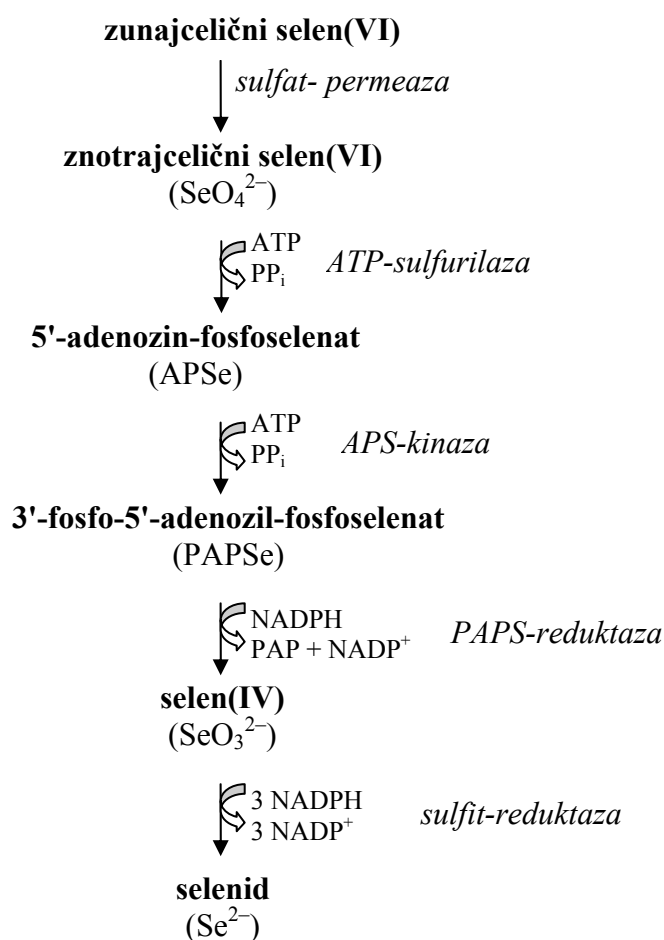
2.2 METABOLIZEM SELENA(VI) PRI KVASOVKAH

Selen(VI) (SeO_4^{2-}) in sulfatni ion (SO_4^{2-}) sta si v kemijskih lastnostih podobna, oba sta zelo stabilna, zato je najprej potrebna aktivacija ionov z ATP, da lahko nadalje poteče njuna redukcija. V celico se selen(VI) prenese preko nespecifičnega prenašalca, permeaznega sistema, ki je skupen tudi prenosu sulfatnega iona (Slika 1) (Turner in sod., 1998; Raspor in sod., 2003).

Prenos sulfatnega iona je sklopljen s prenosom treh vodikovih ionov v celico, poznana pa sta dva prenašalna sistema, z nizko in visoko afiniteto za prenos sulfata. Naslednja reakcija pri sulfatni asimilacijski poti vključuje encim ATP-sulfurilaza, ki s pomočjo ATP aktivira sulfat, kjer nastane 5'-adenozinfosfosulfat (APS). Encim APS-kinaza katalizira fosforilacijo APS do 3'-fosfo-5'-adenozil-fosfosulfata (PAPS), ki ga encim PAPS-

reduktaza katalizira do sulfita. Sulfid se nato reducira do sulfida z encimom sulfid-reduktaza (Slika 1) (Mendoza-Cózatl in sod., 2005).

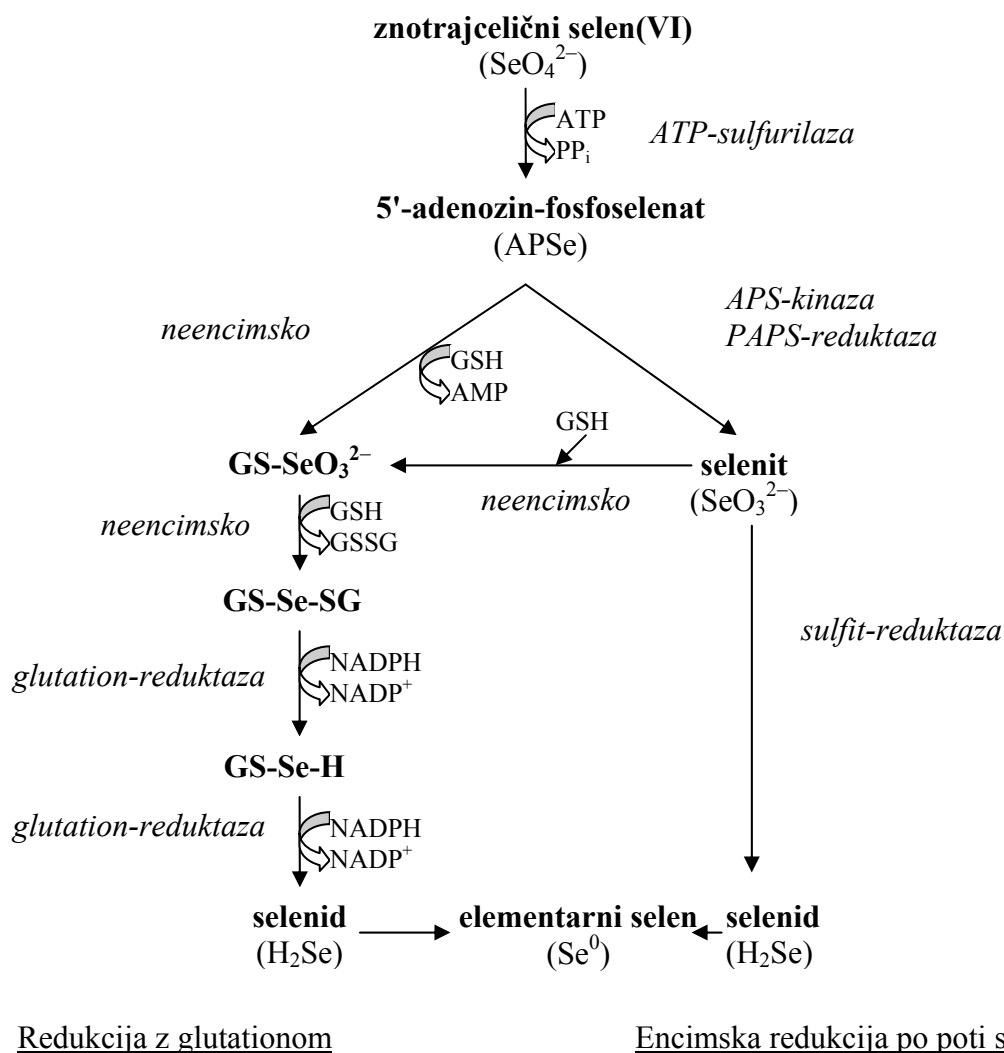
Že leta 1977 sta Dilworth in Bandurski (1977) pri kvasovki vrste *Saccharomyces cerevisiae* dokazala aktivacijo selena(VI) s pomočjo encima ATP-sulfurilaza v prisotnosti magnezijevih ionov (Mg^{2+}) in ATP do adenozin-selenofosfata (APSe), spojine, ki ima enake značilnosti kot APS. Ker pride z aktivacijo selena(VI) do znižanja električnega potenciala, je omogočena nadaljnja redukcija APSe do 3'-fosfo-5'-adenozil-fosfoselenata, ki pa *in vivo* še ni bila dokazana. Nasprotno pa velja za redukcijo selena(IV) (SeO_3^{2-}), ki je bila dokazana tako v samih celicah kot v celičnih ekstraktih kvasovke *S. cerevisiae*, kjer je potekla redukcija do elementarnega selena (Slika 2) (Falcone in Nickerson, 1962).



Slika 1: Metabolizem selena(VI) po asimilacijski poti sulfata pri kvasovkah (prirejeno po Mendoza-Cózatl in sod., 2005)

Selen(IV) se lahko reducira tudi neencimsko s pomočjo reduciranega glutaciona (GSH), kjer najprej nastane glutation-konjugiran selen(IV) ($GS-SeO_3^{2-}$), ta pa se reducira do selendiglutaciona ($GS-Se-SG$) (Slika 2). $GS-Se-SG$ se lahko reducira neencimsko ali encimsko s pomočjo glutation-reduktaze. Neencimska redukcija do selenola ($GS-Se-H$) poteče z GSH kot reducentom, ob prisotnosti NADPH pa poteče encimska redukcija. Prav tako se $GS-Se-H$ encimsko reducira do selenida (H_2Se), ki se lahko porabi za biosintezo

aminokislin selenometionina in selenocisteina, lahko pa se nadalje reducira do elementarnega selena (Slika 2) (Dilworth in Bandurski, 1977; Turner in sod., 1998).



Slika 2: Encimska redukcija selena(VI) po poti sulfata in neencimska redukcija APSe pri kvasovkah (Dilworth in Bandurski, 1977)

2.3 TOKSIČNOST SELENA

Toksičnost selena pri kvasovkah se pojavi v milimolarnih koncentracijah selena. Prav tako je toksičnost odvisna od oksidacijskega stanja selenove spojine ter njene topnosti. Anorganski selen v obliki selena(VI) in selena(IV) je v vodi dobro topen, kar je vzrok tudi za toksičnost, medtem ko je elementarni selen v vodi netopen in najmanj toksičen. Selenid pa je zelo reaktiven in tudi zelo toksičen, zato se celice pred njim zaščitijo tako, da ga oksidirajo v elementarni selen ali ga vgradijo v selenocistein ali selenometionin (Combs, 1993; Gharieb in sod., 1995). V odvisnosti od koncentracije selena le-ta povzroči počasnejšo rast v eksponentni fazi, zmanjša se tudi koncentracija kvasovk, ki vstopajo v stacionarno fazo rasti. Do tega pride zaradi zakasnitve v celičnem ciklu ter povečane umrljivosti med kvasovkami, kar je posledica poškodb DNA. Selen ne povzroči takih poškodb DNA, ki bi morale biti odstranjene z mehanizmom popravljanja z izrezovanjem nukleotidov ali baz, ampak so poškodbe odstranjene z mehanizmom popravljanja, podvrženega napakam (error-prone) (Pinson in sod., 2000).

Kot morebitni vzrok toksičnosti selena pri kvasovkah mnogi navajajo nastajanje reaktivnih kisikovih oblik (ROS) (vodikov peroksid, superoksidni anion) med redukcijskimi procesi. Povečane koncentracije vodikovega peroksida zaradi delovanja encima superoksid-dismutaza lahko povzročijo nastanek hidroksilnega radikala v Fentonovi reakciji (Pinson in sod., 2000; Nordberg in Arnér, 2001; Raspor in sod., 2003). Tudi raziskave na bakterijah nakazujejo, da je možen glavni vzrok toksičnosti selena tvorba superoksidnega aniona, ki naj bi nastal v reakcijah selena z reducirano obliko glutationa (GSH) (neencimska redukcija selena(VI)). Tako je toksičnost selena(IV) povezana z oksidativnim stresom, selen(VI) pa je toksičen le, če pride do redukcije do selena(IV) ali selenola (Bébién in sod., 2002; Turner in sod., 1998). Raziskave pri kvasovki vrste *Schizosaccharomyces pombe* so pokazale, da je tudi pri kvasovkah toksičnost selena(VI) povezana s količino nastalega selena(IV) med redukcijskimi procesi (Raspor in sod., 2003). Predlagan pa je še mehanizem toksičnosti, kjer naj bi prišlo do zamenjave žvepla s selenom v proteinih, kar naj bi porušilo terciarno strukturo proteinov (Gharieb in sod., 1995).

2.3.1 Odpornost na selen

Kvasovke se pred toksičnostjo selena zaščitijo na več načinov. Falcone in Nickerson (1962) sta opazila, da kvasovka *Candida albicans* reducira selen(IV) do elementarnega selena. Pretvorba v netopen elementarni selen kot razstrupljevalni sistem je bila potrjena tudi pri glivah *Aspergillus funiculus* in *Fusarium* sp., kjer so bili opazni kristali elementarnega selena na površini hif in konidijev ter granule elementarnega selena v vakuolah glive *A. funiculus*. Odpornost na selen je dosežena tudi s pretvorbo selena v manj toksične hlapne spojine s pomočjo metilacije ali zaradi zmanjšanja vnosa selena v celico (Gharieb in sod., 1995).

Vpletenost encima ATP-sulfurilaza pri odpornosti na selen(VI) je bila preučevana pri kvasovki vrste *Schizosaccharomyces pombe* (Raspor in sod., 2003). Pri na selen(VI) odpornemu sev, ki ima prekinjen gen za ATP-sulfurilazo, je bila bioakumulacija selena(VI) 10-krat večja kot pri na selen(VI) občutljivemu sev, ko je bila v gojišče

dodana 4 mM koncentracija selen(VI). Pri na selen(VI) občutljivemu sevu je bioakumulacija selen(VI) dosegla vrednost $307 \pm 37 \mu\text{g Se/g}$ suhe biomase, pri na selen(VI) odpornemu sevu pa je bila vrednost bioakumuliranega selen(VI) $3163 \pm 30 \mu\text{g Se/g}$ suhe biomase. Vendar je bila rast pri na selen(VI) občutljivemu sevu močno zmanjšana, pri na selen(VI) odpornemu sevu pa ne. Vzrok temu je aktivnost ATP-sulfurilaze, ki omogoči aktivacijo selen(VI) do APSe ter nadaljnjo redukcijo (Slika 2), kjer naj bi prišlo do tvorbe ROS ter povečane koncentracije selen(IV), ki povzroči poškodbe DNA (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003). Tako je odpornost kvasovk na selen(VI) povezana s količino nastalega selen(IV) in ROS pri redukciji selen(VI), saj sta bila pri dodatku selen(IV) v gojišče oba seva enako občutljiva (Raspor in sod., 2003).

Glavni razstrupljevalni mehanizem selen(IV) pri kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae* je redukcija z reduciranim glutationom (GSH) do elementarnega selen(VI). Ker je selen(IV) prenesen iz citoplazme celice v vakuolo kot glutation-konjugiran selen(IV), se v citoplazmi zmanjšuje vsebnost selen(IV). Vendar lahko pride zaradi dodatnega vnosa selen(IV) iz okolja v kvasno celico do zmanjševanja vsebnosti GSH v citoplazmi ter do oksidativnega stresa zaradi selen(IV) v celici. Poleg tega naj bi nastajali ob encimski in neencimski redukciji selen(VI) ROS, ki jih odstranjujejo antioksidativni obrambni sistemi kvasovk, ti pa še dodatno prispevajo k odpornosti na selen(VI) (Pinson in sod., 2000).

2.4 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres, ki je definiran kot porušeno ravnovesje med tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov, je lahko posledica a) porušenega delovanja antioksidativnih obrambnih sistemov zaradi mutacij v antioksidativnih encimih in/ali pomanjkanja antioksidantov v celici; b) povečane tvorbe ROS zaradi izpostavljenosti celice spojinam, ki vodijo do nastanka ROS ter zaradi aktivacije sistemov za nastanek ROS v celici (Halliwell in Gutteridge, 2000; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Odgovor celic na oksidativni stres je odvisen od obsega oksidativnega stresa. Tako se ob manjših koncentracijah ROS celice na prisotnost ROS prilagodijo in postanejo bolj odporne na oksidativni stres, večje koncentracije ROS pa povzročijo zamik celične delitve in indukcijo antioksidativnih obrambnih in popravljalnih sistemov. Zelo velike koncentracije ROS, ki jih celice ne zmorejo odstraniti oz. popraviti poškodb zaradi prisotnosti ROS, pa vodijo v programirano celično smrt (apoptoza). Da se celice izognejo oksidativnemu stresu, mora biti zagotovljeno celično ravnotežje med antioksidativnimi obrambnimi sistemi ter prisotnostjo ROS (Jamieson, 1998; Temple in sod., 2005).

2.4.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom (Sigler in sod., 1999). ROS ne zajema le prostih radikalov, kot so superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni (ROO^{\cdot}) in alkoksilni radikal (RO^{\cdot}), temveč tudi reaktivne kisikove spojine, med njimi vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloro kislino ($HOCl$) in singletni kisik (1O_2) (Gomes in sod., 2005). Če primarni ROS ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$) reagirajo z makromolekulami (DNA, lipidi, proteini), le-to vodi v nastanek sekundarnih ROS (hidroperoksidni, alkoksi in peroksilni radikali) (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Primarni nastanek ROS v celici je puščanje elektronov v dihalni verigi med redukcijo molekulskega kisika do vode, kjer se ob normalnih fizioloških pogojih 1–5 % O_2 v mitohondrijih pretvori v ROS (Camougrand in Rigoulet, 2001; Temple in sod., 2005). Prav tako pa nastanejo tudi ob prisotnosti prehodnih kovin (Fe, Cu ...), ki pospešijo prehod enega elektrona na O_2 in nastanek $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Kot že omenjeno, naj bi bil nastanek ROS povezan tudi z redukcijskimi procesi selena(VI) po transportu v celico. ROS naj bi nastajali predvsem med redukcijo selena(IV) po predhodni aktivaciji selena(VI) z encimom ATP-sulfurilaza ter v neencimski redukciji selena(VI) z reducirano obliko glutationa (GSH) (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003).

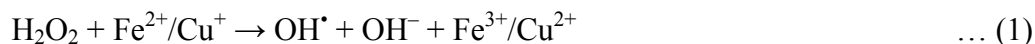
2.4.1.1 Superoksidni anion

Superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) nastane pri redukciji kisika v dihalni verigi, avtooksidaciji znotrajceličnih spojin (kateholi, kinoli, flavini,...) ter pri različnih transportnih sistemih. Ne povzroči peroksidacije lipidov in je slabo reaktiven, vendar lahko kljub temu povzroči inhibicijo glutation-peroksidaze ter delno tudi katalaze, ki spadajo med encime antioksidativne obrambe. Reagira lahko tudi z encimi, ki vsebujejo Fe-S gruče, kar povzroči inaktivacijo encimov in povečano koncentracijo železa v celici. Tako sproščeno železo lahko reagira z vodikovim peroksidom v Fentonovi reakciji, kjer nastane hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) (enačba 1) (Sigler in sod., 1999; Nordberg in Arnér, 2001). Superoksidni anion se v mitohondrijih kvasovk odstranjuje s pomočjo encima Mn-vsebujoče superoksid-dimutaze (SOD), v citoplazmi pa z encimom Cu,ZnSOD (Ravindranath in Fridovich, 1973).

2.4.1.2 Vodikov peroksid

Kot posledica delovanja MnSOD v mitohondrijih ter Cu,ZnSOD v citoplazmi nastane vodikov peroksid (H_2O_2). Nastane lahko tudi pri avtooksidaciji hemoproteinov in flavoproteinov ter kot encimski produkt oksidaz (Nordberg in Arnér, 2001). V kislem in nevtralnem območju pH obstaja vodikov peroksid v popolnoma protoniranem stanju. Ker nima naboja, lahko molekula vodikovega peroksida prehaja celično membrano. Če reagira

s prehodnimi kovinami (Fe, Cu), pride do razgradnje H_2O_2 in nastanka hidroksilnega radikala (OH^\bullet) ter hidroksidnega aniona (OH^-), kar imenujemo Fentonova reakcija (enačba 1) (Sigler in sod., 1999):



Odstranjevanje vodikovega peroksida poteka z dvema encimoma, in sicer z glutation-peroksidazo (GPX) ter katalazo (CAT) (Nordberg in Arnér, 2001).

2.4.1.3 Hidroksilni radikal

Hidroksilni radikal (OH^\bullet) je najbolj reaktiven med ROS in lahko reagira z makromolekulami v celici (DNA, lipidi, proteini). Tvori se v Fentonovi reakciji (enačba 1), ki je primarni vir hidroksilnega radikala v celici, v reakciji superoksidnega aniona s perkloro kislino ter pri razpadu kovalentne vezi vode zaradi visoko energetskega sevanja (Sigler in sod., 1999). Oksidirane oblike prehodnih kovin v Fentonovi reakciji (enačba 1) se lahko reducirajo s pomočjo superoksidnega aniona v Haber-Weissovi reakciji (enačba 2).



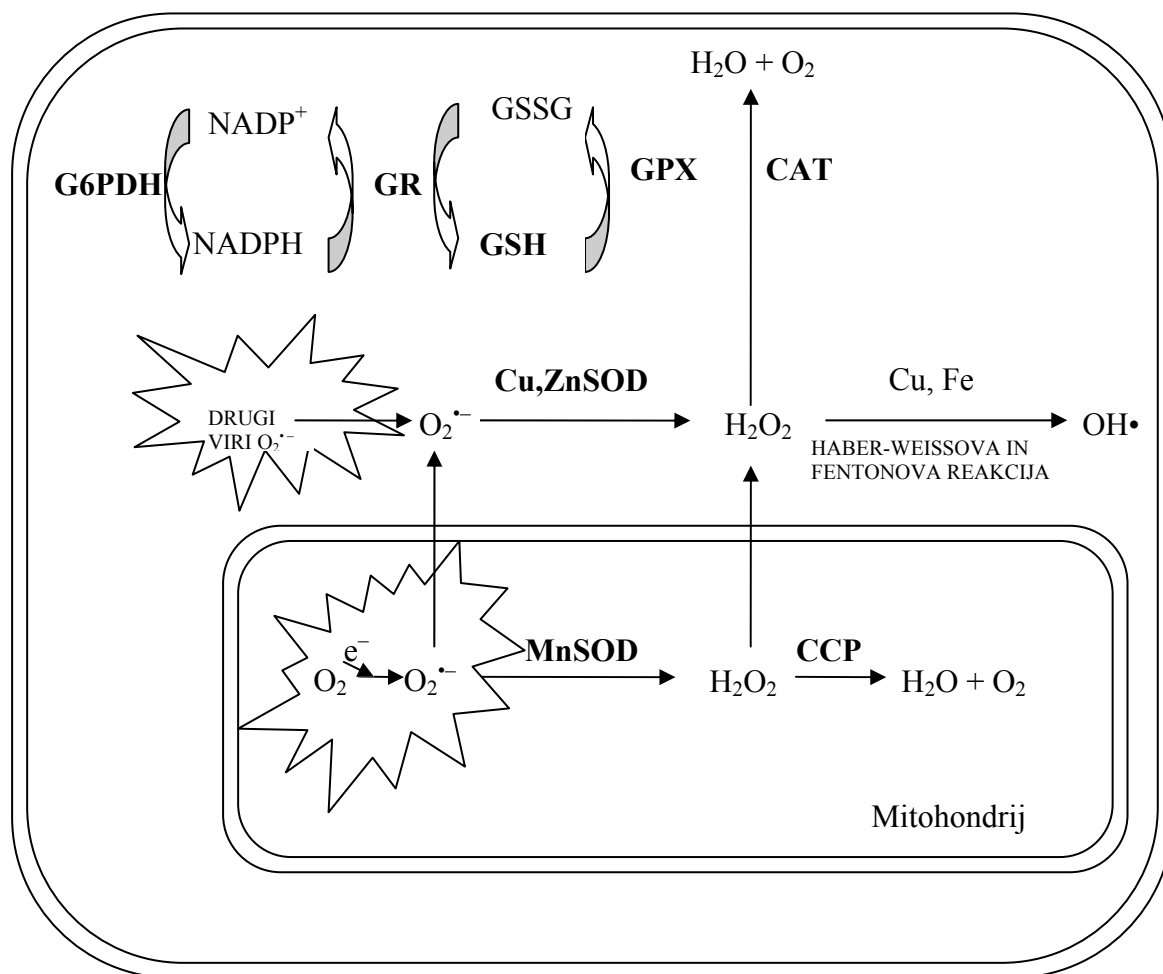
Tako reducirane prehodne kovine lahko ponovno reagirajo z vodikovim peroksidom, kar zopet vodi v nastanek hidroksilnega radikala (Nordberg in Arnér, 2001).

2.5 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI

Zaradi nastanka ROS in možnih poškodb celice so kvasovke, kakor tudi drugi organizmi, razvile antioksidativne obrambne sisteme. Razdelimo jih na primarne, ki odstranjujejo ali sodelujejo pri odstranjevanju ROS, ter sekundarne antioksidativne obrambne sisteme, ki vključujejo sisteme za popraviljanje ali odstranjevanje poškodovanih molekul, pregled le-teh pa je predstavljen v Preglednici 1. Primarni antioksidativni obrambni sistem vključuje encimski in neencimski antioksidativni obrambni sistem (Jamieson, 1998; Moradas-Ferreira in Costa, 2000).

Preglednica 1: Primarni in sekundarni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in Costa, 2000)

Primarni sistemi	Funkcija
<i>Encimski</i>	
Cu,Zn-superoksid-dismutaza	Odstranjevanje $O_2^{\cdot-}$ v citoplazmi
Mn-superoksid-dismutaza	Odstranjevanje $O_2^{\cdot-}$ v mitohondriju
Katalaza A	Razgradnja H_2O_2 v peroksisomih
Katalaza T	Razgradnja H_2O_2 v citoplazmi
Citokrom-C-peroksidaza	Razgradnja H_2O_2 v mitohondriju
Glutation-peroksidaza	Razgradnja H_2O_2 in lipidnih hidroperoksidov
Glutation-reduktaza	Redukcija oksidirane glutationa
Tioredotsin-peroksidaza	Razgradnja in alkilnih hidroperoksidov
Tioredotsin-reduktaza	Redukcija oksidirane tioredotsina
Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza	Redukcija $NADP^+$ v NADPH
<i>Neencimski</i>	
Glutation	Odstranjevanje prostih radikalov, združevanje z elektrofilni
Metalotionini	Vezava Cu, odstranjevanje $O_2^{\cdot-}$ in OH^{\cdot}
Tioredotsin	Redukcija oksidirane glutationa
Poliaini	Vezava Cu, zaščita lipidov pred oksidacijo
Ubikvinon	Lovljenje lipidnih radikalov
<i>Sekundarni sistemi</i>	
8-okso-gvanin-glikozilaza/liaza	Izrezovanje oksidiranih DNA baz
AP-endonukleaza	Rezanje apurinskih/apirimidinskih (AP) mest, tvorba 3'-hidroksilnih skupni na AP mestih
Metionin-sulfoksid-izomeraza	Redukcija metionin-sulfoksidov
Protein-disulfid-izomeraza	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Glutation	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Tioredotsin	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Glutaredoksin	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Stresni proteini HSP (heat shock proteins)	Sodelujejo pri razgradnji oksidiranih proteinov



Slika 3: Poenostavljen pregled antioksidativnega obrambnega sistema (Nordberg in Arner, 2001)

2.5.1 Encimski antioksidativni obrambni sistemi

2.5.1.1 Superoksid-dismutaza

Kvasovke lahko s pomočjo encima superoksid-dismutaza (SOD) katalizirajo pretvorbo superoksidnega aniona ($O_2^{\cdot-}$) v vodikov peroksid in kisik (enačba 3) (Ravindranath in Fridovich, 1973). Ker je glavni vir $O_2^{\cdot-}$ v kvasovkah mitohondrij, vsebujejo mitohondriji mitohondrijsko, mangan vsebujočo SOD (MnSOD). Kot že omenjeno pa lahko $O_2^{\cdot-}$ nastaja tudi v citoplazmi, kjer odstranjevanje katalizira citoplazemska, baker in cink vsebujoča SOD (Cu,ZnSOD) (Nordberg in Arnér, 2001).



Superoksid-dismutaza je med encimi antioksidativnega obrambnega sistema prvi, ki s svojim delovanjem v kvasovkah prepreči povečano koncentracijo superoksidnega aniona, le-ta pa je prvi v verigi nastajanja ROS (Ibrahim in sod, 2000). Največ (85 %)

superoksidnega aniona se odstrani s pomočjo citoplazemske SOD (Lee in sod., 2002). Pri kvasovkah vrste *Saccharomyces pombe* je aktivnost MnSOD med oksidativnim stresom nujna, saj so mutacije v genih, ki kodirajo encim MnSOD, letalne za kvasovke, kar so dokazali Jeong in sod. (2001).

2.5.1.2 Katalaza

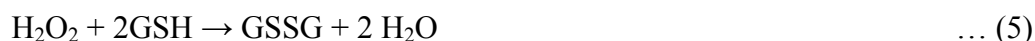
Katalaza, ki odstranjuje vodikov peroksid (enačba 4), se pri kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) nahaja v peroksisomih (katalaza A) ter v citoplazmi (katalaza T) (Jamieson, 1998).



Izawa in sod. (1996) predvidevajo, da v normalnih fizioloških pogojih rasti pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* katalaza nima večjega pomena pri odstranjevanju vodikovega peroksida, saj ima encim glutation-peroksidaza večjo afiniteto do vodikovega peroksida. Pomembno vlogo pa ima kot antioksidativni encim pri pridobivanju odpornosti na oksidativni stres.

2.5.1.3 Glutation-peroksidaza

Glutation-peroksidaza (GPX) katalizira redukcijo vodikovega peroksida (enačba 5) tako, da oksidira reduciran glutation (GSH) (Jamieson, 1998).



Glutation-peroksidaza kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* ima za razliko od sesalskega encima GPX v aktivnem mestu aminokislino cistein in ne selenocistein (Yamada in sod., 1999).

2.5.1.4 Glutation-reduktaza

Ker mora celica ohranjati razmerje med reduciranim (GSH) in oksidiranim glutationom (GSSG) v prid prvemu, vsebujejo kvasovke med antioksidativnimi encimi tudi encim glutation-reduktaza (GR). Le-ta katalizira naslednjo reakcijo (Jamieson, 1998):



2.5.1.5 Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza

Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH) je ključni encim v poti pentoze-fosfata, razgradnji glukoze, ki poteka v kvasovkah takrat, ko mora celica zagotoviti redukcijsko moč v obliki NADPH. Med oksidativnim stresom pride do indukcije encimov antioksidativnega obrambnega sistema. Mednje sodi tudi encim glutation-reduktaza, ki za

kataliziranje pretvorbe oksidirane glutaciona v reducirano obliko, potrebuje NADPH, kar zagotavlja encim G6PDH (Godon in sod., 1998; Izawa in sod., 1998).

2.5.2 Neencimski antioksidativni obrambni sistemi

Neencimske antioksidativne obrambne sisteme sestavljajo molekule z manjšo molekulsko maso, ki so topne bodisi v hidrofilnem bodisi v lipofilnem okolju. Med njimi so glutacion, tioredoksin, glutaredoksin, askorbinska kislina, fitokelatini, poliamini in trehaloza (Jamieson, 1998). Delujejo kot odstranjevalci ROS, ob tem pa se oksidirajo. Najpomembnejši med njimi je reducirana oblika tripeptida (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicin) glutaciona (GSH) z reaktivno tiolno skupino (Jamieson, 1998). GSH ima v celici pomembno vlogo kot antioksidant, saj lahko neposredno katalizira pretvorbo OH^\bullet do vode, reagira pa tudi z drugimi oblikami ROS (RO^\bullet , HOCl) (Halliwell in Gutteridge, 2000; Sugiyama in sod., 2000).

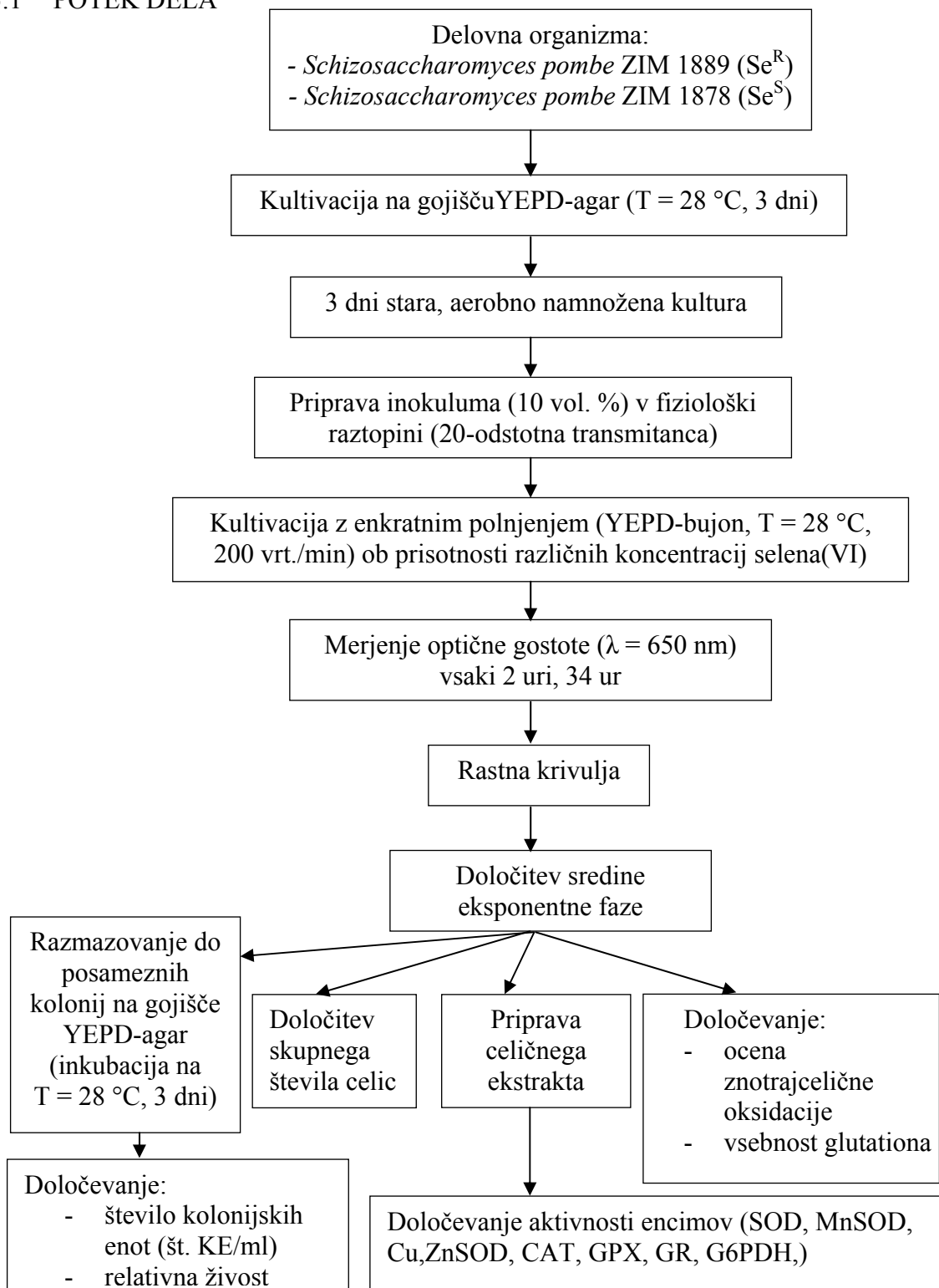
Pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* vsebnost glutaciona predstavlja več kot 95 % neproteinskih tiolov oziroma 0,5-1 % suhe mase, koncentracija glutaciona v celici pa lahko doseže vrednost 10 mM (Penninckx, 2000). Zaradi nizkega redoks potenciala ter ohranjanja reducirane oblike GSH s pomočjo encima glutacion-reduktaza (GR) deluje GSH kot celični redoks pufer (Penninckx, 2002). GSH je pomemben tudi kot donor elektronov encimom, med njimi glutacion-peroksidazi (GPX), pri zaščiti proteinov s tiolnimi skupinami pred ireverzibilno oksidacijo ter pri razstrupljanju različnih toksičnih spojin, med katerimi je tudi selen (Penninckx, 2000; Sugiyama in sod., 2000).

Poleg odstranjevanja ROS pa lahko GSH reagira tudi s selenom v neencimski redukciji (Slika 2). S tem pride do zmanjševanja znotrajceličnih koncentracij selena(IV) in prenosa selena(IV) v glutacion-konjugiran selen(IV) v vakuolo, vendar se hkrati zmanjšuje tudi vsebnost GSH v citoplazmi. Do ponovne redukcije glutaciona v vakuolah ne prihaja, kar še dodatno prispeva k zmanjševanju vsebnosti GSH v celicah (Pinson in sod., 2000).

Tako encimski kot neencimski antioksidativni obrambni sistemi so pomembni pri zmanjševanju oksidativnega stresa, ki ga lahko povzroči tudi selen(VI). Vzroki nastanka oksidativnega stresa pri kvasovkah izpostavljene selenu(VI) in toksičnost selena(VI) še niso podrobneje raziskani. Predvideva se, da je toksičnost selena(VI) povezana z nastankom ROS med redukcijskimi procesi selena(VI) in posledično oksidativnim stresom, ki ga celice skušajo v čim večji meri odstraniti (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 4: Hodogram poskusa

3.2 MATERIALI

3.2.1 Kvasovka *Schizosaccharomyces pombe*

V poskusih smo uporabili dva seva kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Sev *S. pombe* ZIM 1889 je na selen(VI) odporen (Se^R), sev *S. pombe* ZIM 1878 pa na selen(VI) občutljiv (Se^S) sev. Vzrok za odpornost na selen(VI) pri sevu ZIM 1889 je poškodovana sulfatna transportna pot, saj je gen, ki kodira ATP-sulfurilazo, prekinjen. Sev ZIM 1878 (Se^S) ima nepoškodovano sulfatno transportno pot, ki jo uporablja tudi selen(VI) za vstop v celico.

Celice kvasovke *S. pombe* so ovalne oblike, dolge 5–7 μm ter široke 3–5 μm . Razmnožujejo se nespolno z mitotično delitvijo, tik pred delitvijo pa so celice daljše. Genom velik 13,8 Mb sestavljajo trije kromosomi. Kvasovka *S. pombe* je haploiden mikroorganizem z dvema paritvenimi tipi, h^+ ter h^- . V neugodnih razmerah lahko pride do nastanka askospor s konjugacijo dveh haploidnih celic nasprotnega paritvenega tipa (Pitt in Hocking, 1997; Yanagida, 2002).

Oba seva kvasovk smo med delom revitalizirali na gojišču YEPD-agar ter hranili na 4 °C.

3.2.2 Gojišča

Uporabili smo dve gojišči, YEPD-agar in YEPD-bujon. YEPD-agar smo uporabljali za določevanje števila kolonijskih enot, relativne živosti in za precepljanje na selen(VI) občutljivi sev kvasovke *S. pombe*. Za ohranjanje na selen(VI) odporne kvasovke smo YEPD-agarju dodali selen(VI) (kot Na_2SeO_4) do končne koncentracije 0,4 mM v gojišču za konstanten selekcijski pritisk. YEPD-bujon smo uporabljali za aerobne kultivacije.

YEPD-agar smo pred sterilizacijo ($T = 121\text{ °C}$, 1,1 bar, 20 min) zaklejili. Po končani sterilizaciji smo agar razlili v plošče. YEPD-bujonu pa smo pred sterilizacijo vrednost pH uravnali na 4,6 z dodatkom 1 M HCl ali 1 M NaOH.

Sestava obeh gojišč je podana v Preglednici 2.

Preglednica 2: Sestava YEPD-agarja in YEPD-bujona (Raspor in Smole-Možina, 1993)

	YEPD-agar	YEPD-bujon
Kvasni ekstrakt (m.g., Biolife)	1 %	1 %
Bakteriološki pepton (m.g., Oxoid)	1 %	1 %
Brezvodna glukoza (p.a., Kemika)	2 %	2 %
Agar (m.g., Biolife)	2 %	
Destilirana voda		

3.2.3 Reagenti in raztopine

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili številne spodaj naštetе reagente in raztopine, ki so razvrščene glede na uporabo pri posameznih metodah. Vse spodaj naštetе raztopine so vodne raztopine, razen če ni navedeno drugače.

0,2 M založna vodna raztopina selen(VI), topljenec kot Na_2SeO_4 , natrijev selenat(VI) (p.a., Fluka)

Fiziološka raztopina, 0,9-odstotni NaCl (p.a., Merck)

Uravnavanje vrednosti pH YEPD-bujona:

- 1 M NaOH (p.a., Merck)
- 1 M HCl (36 %, Merck)

Določevanje koncentracije proteinov:

- goveji serumski albumin (BSA) (100 %, Sigma)
- 0,15 M NaCl (p.a., Merck)
- Bradfordov reagent (BioRad)

Priprava celičnega ekstrakta:

- tekoči N_2
- 15 mM fosfatni puffer (KH_2PO_4) (p.a., Merck)
- 50 mM vodna raztopina fosfatnega pufra s pH-vrednostjo 7,0
- inhibitor proteaz (Roche)

Priprava 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufra s pH-vrednostjo 7,0: 50 mM vodni raztopini K_2HPO_4 (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 50 mM vodno raztopino KH_2PO_4 (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

Ocena znotrajcelične oksidacije:

- 50 mM vodna raztopina fosfatnega pufra s pH-vrednostjo 7,8
- 1 mM H_2DCFDA (dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetat) (min. 97 %, Sigma) v 96-odstotnem etanolu (Merck)

Priprava 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufra s pH-vrednostjo 7,8: 50 mM vodni raztopini K_2HPO_4 (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 50 mM vodno raztopino KH_2PO_4 (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

Določevanje aktivnosti encimov superoksid-dismutaz (Cu,ZnSOD in MnSOD):

- 50 mM vodna raztopina fosfatnega pufra s pH-vrednostjo 7,8
- 1 mM EDTA (p.a., Kemika) v vodni raztopini 50 mM kalijevega fosfatnega pufra
- 1 mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma)
- 0,1 M metionin (Sigma)
- 0,16 mM riboflavin (Sigma)
- 0,6 M KCN (Riedel-de-Haën)

Priprava 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,8: 50 mM vodni raztopini K_2HPO_4 (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 50 mM vodno raztopino KH_2PO_4 (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

Določevanje aktivnosti katalaze (CAT):

- 50 mM vodna raztopina fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0
- 30 mM H_2O_2 (30 %, Merck) v kalijevem fosfatnem pufru

Priprava 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0: 50 mM vodni raztopini K_2HPO_4 (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 50 mM vodno raztopino KH_2PO_4 (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

Določevanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GPX):

- 50 mM vodna raztopina fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0
- 100 mM EDTA (p.a., Kemika)
- 100 mM NaN_3 (min. 99,5 %, Sigma)
- 10 mM NADPH (94 %, Sigma)
- 0,1 U/ml glutacion-reduktaze (Sigma)
- 10 mM vodna raztopina H_2O_2 (30 %, Merck)
- 10 mM glutacion (reducirana oblika) (min 98 %, Sigma)

Priprava 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0: 50 mM vodni raztopini K_2HPO_4 (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 50 mM vodno raztopino KH_2PO_4 (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

Določevanje aktivnosti glutacion-reduktaze (GR):

- 100 mM vodna raztopina fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0
- 25 mM GSSG (oksidirana oblika glutaciona) (98 %, Sigma)
- 10 mM NADPH (94 %, Sigma)

Priprava 100 mM vodne raztopine fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0: 100 mM vodni raztopini K_2HPO_4 (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 100 mM vodno raztopino KH_2PO_4 (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

Določevanje aktivnosti glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PDH):

- 50 mM Tris-hidroklorni pufer pH = 8,0 (99 %, Sigma)
- 250 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (min. 99 %, Sigma)
- 50 mM glukoza-6-fosfat (100 %, Sigma)
- 40 mM $NADP^+$ (min. 98 %, Sigma)

Določevanje vsebnosti glutaciona (GSH) v reducirani obliki:

- 50 mM vodna raztopina fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0

- 4 mM EDTA v 2 M HClO₄ (70 %, Merck)
- 15 mM fosfatni pufer (KH₂PO₄) (p.a., Merck)
- 3 M KOH (p.a., Merck)
- 0,4 % (w/v) DTNB (Sigma) v 50 mM fosfatnemu pufru pH 7

Priprava 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru s pH-vrednostjo 7,0: 50 mM vodni raztopini K₂HPO₄ (Merck) smo na magnetnem mešalu počasi dodajali 50 mM vodno raztopino KH₂PO₄ (Merck) in pri tem stalno spremljali pH-vrednost.

3.2.4 Oprema

Steklovina in potrošni material:

- bakteriološke epruvete
- centrifugirke (100 ml, 1,5 ml)
- čaše
- erlenmajerice (0,5 L) s stransko roko
- kvarčne kivete (Hellma)
- merilne bučke
- merilni valji
- petrijeve plošče
- plastične kivete (Sarstedt)
- steklene kroglice (Sigma)
- števna ploščica Bürker-Türk

Aparature:

- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Gilson)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122)
- centrifuge (Tehtnica Železniki LC-321, Eppendorf 5415C, Sigma 3K30)
- čitalec mikrotiterskih plošč (Tecan)
- digestorij
- hladilnik (LTH)
- inkubator (Jouan IG150)
- magnetno mešalo (Tehtnica Železniki 550 M)
- mikroskop (Leica ATC 2000)
- pH-meter (Mettler Toledo)
- rotacijski stresalnik (Tehtnica Železniki)
- spektrofotometer (Iskra MA 9520) za merjenje optične gostote
- spektrofotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000)
- sušilnik (Sutjeska)
- tehtnica (Sartorius analytic)
- tehtnica (Sartorius excellence)
- vodna kopel (Heto)
- zamrzovalna omara -80 °C (Heto Ultra Freeze)
- zamrzovalna skrinja (Gorenje)

Programska oprema:

- Magellan (Tecan)
- Swift-Reaction Kinetics (Pharmacia)

3.3 METODE

3.3.1 Aerobne kultivacije z enkratnim polnjenjem

Za aerobne kultivacije z enkratnim polnjenjem smo vedno uporabili 3 dni staro kvasno biomaso z agarških plošč. Inokulum smo pripravili tako, da smo kvasno biomaso s cepilno zanko prenesli v fiziološko raztopino do 20 % transmitance ($\lambda = 650$). Nato smo dodali 10 vol. % inokuluma v 500 ml-erlenmajerice s stransko kiveto z 90 ml gojišča YEPD-bujon. V gojišče smo dodali še vodno raztopino selena(VI) do končne koncentracije v gojišču 4 mM, 0,4 mM in 0,04 mM. Vedno smo ob tem imeli tudi kontrolni vzorec (brez dodanega selena(VI) v gojišču). Vzorce smo inkubirali na stresalniku (200 vrt./min, $T = 28$ °C) in merili optično gostoto ($\lambda = 650$ nm) ob inokulaciji ter nato vsaki dve uri med časom $t = 10$ h in $t = 20$ h. Zadnja meritev je bila opravljena ob času $t = 34$ h. Delo je potekalo v dveh paralelkah.

Za umerjanje spektrofotometra smo uporabili slepi vzorec (gojišče z 10 vol. % fiziološke raztopine). S spremljanjem optične gostote smo izrisali rastno krivuljo (odvisnost optične gostote od časa kultivacije) in določili sredino eksponentne faze rasti kvasovke *S. pombe*.

3.3.2 Določanje kultivabilnosti kvasovk in skupnega števila celic

Kultivabilnost kvasovk smo določili tako, da smo vzorcem odvzeli 1 ml kulture, ki smo jo razredčili v fiziološki raztopini po Kochu. Na plošče z YEPD-agarjem smo dodali 50 μ L ustrezne razredčitve in jo s pomočjo sterilnih 5-mm steklenih kroglic razmazali po celotni površini gojišča. Vedno smo razmazali dve razredčitvi obeh paralelnih vzorcev v treh ponovitvah. Plošče smo inkubirali 3 dni pri temperaturi $T = 28$ °C. Iz vsake žive celice, ki je sposobna razmnoževanja, zraste kolonija, ki smo jih prešteli. Rezultat smo podali kot število kolonijskih enot/ml (KE/ml). Nato smo izračunali še relativno živost (Raspor in sod., 1999).

Izračun števila kolonijskih enot:

$$\text{št. KE / ml} = \frac{Y}{R \times V} \quad \dots (7)$$

Y - število kolonijskih enot prešteti na plošči; R - faktor redčitve; V - volumen redčitve brozge, ki smo ga razmazali na plošče (0,050 ml)

Izračun relativne živosti:

$$\text{Rel. živost (\%)} = \frac{(\text{št. KE/ml})_{\text{vzorca}}}{(\text{št. KE/ml})_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad \dots (8)$$

(št. KE/ml)_{vzorca} – število kolonijskih enot pri določeni koncentraciji selena(VI) (0,04–4 mM); (št. KE/ml)_{kontrola} – število kolonijskih enot pri kontroli (vzorec brez dodanega selena(VI))

Skupno število celic v sredini eksponente faze smo določili tako, da smo izmerili optično gostoto vzorcev ($\lambda = 650 \text{ nm}$) in iz umeritvene krivulje (Priloga B1) izračunali število celic/ml, kar je podano z enačbo:

$$\text{št. celic/ml } (\times 10^6) = 13,723 \times OD_{650} + 0,0674 \quad \dots (9)$$

3.3.3 Ocena znotrajcelične oksidacije

Z uporabo barvila dihidro-2,7-diklorofluorescein (H_2DCF) smo ocenili znotrajcelično oksidacijo. Barvilo v obliki diacetata (H_2DCFDA) je sposobno prehajanja v celice s pasivnim transportom, kjer se s pomočjo znotrajceličnih esteraz deacetilira do H_2DCF . Oksidacija v prisotnosti oksidantov v celici povzroči nastanek fluorescentne oblike spojine DCFL (2,7-diklorofluorescein 9-lakton), merjenje intenzitete fluorescence pa je merilo za znotrajcelično oksidacijo (Jakubowski in Bartosz, 2000).

Zaradi nestabilnosti ROS in njihove reaktivnosti je ocena tvorbe ROS v primerjavi z merjenjem aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema in vsebnosti glutationa v celici težavnejša (Jakubowski in Bartosz, 2000). Katere oblike ROS lahko povzročijo oksidacijo H_2DCF , še ni popolnoma razjasnjeno. Superoksidni anion naj ne bi bil sposoben oksidacije H_2DCF , prav tako velja to za HOCl (Myhre in sod., 2003).

DCFL se lahko fotoreducira s pomočjo vidne svetlobe ali UVA sevanja. Redukcijski mehanizem naj bi vključeval tvorbo radikalske oblike DCFL, ki ob prisotnosti kisika sproži nastanek superoksidnega aniona. Iz superoksidnega aniona lahko zaradi delovanja encimov SOD nastane vodikov peroksid, ki za razliko od superoksidnega aniona lahko povzroči oksidacijo H_2DCF , kar pomeni povečano oksidacijo na račun izpostavljenosti barvila svetlobi. Poleg neencimskega nastanka radikalske oblike DCFL je možen encimatski nastanek tudi s pomočjo peroksidaze in vodikovega peroksida (Chignell in Sik, 2003).

Zaradi spontane avtooksidacije H_2DCF na zraku, zmanjševanja oksidacije H_2DCF v prisotnosti reduciranega glutationa, ponovne redukcije že oksidirane oblike barvila zaradi celičnih reductentov in zgoraj opisanega sta Jakubowski in Bartosz (2000) predlagala uporabo barvila H_2DCF kot oceno znotrajcelične oksidacije in ne kot ocene tvorbe ROS. Hkrati prihaja do tekmovanja za ROS med barvilom in encimskimi antioksidativnimi sistemi, zato ocena tvorbe ROS ne bi bila realni odraz koncentracije ROS v celici, saj se z barvilom oceni le presežek ROS, ki se z antioksidativnimi obrambnimi sistemi ne odstranijo.

Znotrajcelično oksidacijo smo določevali v sredini eksponente faze, kjer smo odcentrifugirali brozgo (5 min, 4000 vrt./min) in sprali s 50 mM vodno raztopino fosfatnega pufra (pH 7,8). Z enakim pufrom smo pripravili 1-odstotno (w/v) suspenzijo, dobro premešali in inkubirali 10 min na stresalniku (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$). Dodali smo 1 mM založno raztopino H_2DCFDA pripravljeno v 96-odstotnem etanolu, da smo dosegli končno koncentracijo barvila $10 \text{ } \mu\text{M}$. Nato smo vzorce stresali 120 min v temi na stresalniku (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$), da smo dosegli prehod barvila preko celične

membrane s pasivno difuzijo v celice, kjer poteče deacetilacija do H₂DCF (Jakubowski in Bartosz, 1997). Po inkubaciji smo odpipetirali 1 ml vzorca v Eppendorferjeve centrifugirke in jih centrifugirali 3 min pri 4000 vrt./min. Odpipetirali smo 0,2 ml supernatanta v treh ponovitvah v mikrotitrsko ploščo, ki smo jo vstavili v čitalec mikrotiterskih plošč Tecan. S pomočjo računalniškega programa Magellan smo vzorcem pri vzbujevalni svetlobi 488 nm izmerili fluorescenco pri 520 nm. Za slepi vzorec smo namesto vzorcev uporabili 50 mM vodno raztopino fosfatnega pufru (pH 7,8), ki smo mu prav tako kot ostalim vzorcem dodali barvilo in inkubirali 120 min.

Vzporedno smo po 120-minutni inkubaciji vzorce ustrezno redčili in jim izmerili optično gostoto (OD) ($\lambda = 650$ nm), nato pa iz umeritvene krivulje (Priloga B1) izračunali skupno število celic v vzorcih. Umeritvena krivulja je bila predhodno pripravljena tako, da smo redčenim vzorcem izmerili OD₆₅₀ in s pomočjo hemocitometra prešteli število celic. Ocena znotrajcelične oksidacije je podana z enačbo 10.

$$\text{rel. int. fluoresc. (RFE}/10^7 \text{ celic/ml)} = \frac{\text{RFE}_{\text{vzorca}}}{\text{št.celic}} \quad \dots (10)$$

RFE_{vzorca} - relativna intenziteta fluorescence; št. celic - število celic v 1-odstotni suspenziji

Zaradi lažje primerjave med vzorci smo oceno znotrajcelične oksidacije podali v relativnih vrednostih tako, da smo izračun vzorcev primerjali z izračunom kontrolnega vzorca in rezultate izrazili v odstotkih.

3.3.4 Priprava celičnega ekstrakta

Brozge različnih vzorcev v sredini eksponentne faze smo odcentrifugirali (4000 vrt./min, 5 min), tako da smo dobili čim večjo količino mokre biomase. Sledilo je 2-kratno spiranje s 15 mM fosfatnim pufrom (pH = 4,0). Nato smo v stehane terilnice (sprane z 10-odstotno HNO₃, suhe) prenesli mokro biomaso in jo prelili s tekočim dušikom. Ko je le-ta ves izparel, smo biomaso strli in jo tako odmrznili. Postopek prelivanja s tekočim dušikom in odmrzovanja s trenjem smo ponovili 3-krat. Biomasi smo dodali 50 mM fosfatni pufer (pH = 7,0) z inhibitorjem proteaz (pH = 7,0) v razmerju biomasa : pufer = 1 : 5. Vzorce smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali (T = 4 °C, 20000 × g, 20 min). Supernatant smo shranili v sterilne epice na -80 °C za kasnejše analize.

3.3.5 Določevanje topnih proteinov v celičnem ekstraktu

Koncentracijo topnih proteinov v celičnem ekstraktu smo določevali z metodo po Bradfordu (1976). Celični ekstrakt (50 µL) smo odpipetirali v male steklene epruvete in dodali 2,5 ml razredčenega Bradfordovega reagenta (BR) (1 del BR, 4 deli destilirane vode). Vzporedno smo pripravili slepi vzorec, ki smo mu dodali 50 µl 0,15 M NaCl namesto celičnega ekstrakta. Vzorce smo premešali in inkubirali 5 min, ter nato pa izmerili absorbanco ($\lambda = 595$ nm), tako da smo spektrofotometer umerili na slep vzorec. Izdelana

umeritvena krivulja je bila linearna v območju 0-1,2, če so rezultati meritev bili izven tega območja, smo vzorce primerno redčili.

Za umeritveno krivuljo smo uporabili znane koncentracije govejega serumskega albumina (BSA) razredčenega v 0,15 M NaCl (Priloga A1). Količino proteinov (μg) v 50 μl vzorca smo izračunali s pomočjo enačbe:

$$\text{masa proteinov} = \frac{A_{595} - 0,0289}{0,0189} \quad \dots (11)$$

3.3.6 Določevanje encimskih aktivnosti antioksidativnih obrambnih sistemov

Encimske aktivnosti katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPX), glutation-reduktaze (GR) in glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PDH) smo izračunali iz naklona absorpcijske premice. Rezultat smo podali v encimskih enotah U, kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki oksidira oz. reducira 1 μmol substrata v 1 minuti. Aktivnost encimov smo merili 3 minute v 30-sekundnih intervalih s pomočjo programa za nadzor spektrofotometra Swift-Reaction Kinetics pri 25 °C in predpisani valovni dolžini za posamezen encim. Aktivnost encima je izračunana s pomočjo Beer-Lambertovega zakona, ki je podan z enačbo 12:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times c \times l \quad \dots (12)$$

A – absorbanca; I_0 in I intenziteta vhodne in izhodne svetlobe; ε – molarni ekstincijski koeficient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); c – koncentracija vzorca oz. substrata (M); l – dolžina poti žarka skozi vzorec (1 cm)

Pri merjenju encimske aktivnosti merimo spremembo koncentracije substrata s časom tako, da merimo spremembo absorbance v času:

$$\frac{\Delta c}{\text{min}} = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \times l} \quad \dots (13)$$

Aktivnost encima v encimskih enotah izračunamo s pomočjo enačbe 14:

$$U = \mu\text{mol} / \text{min} = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \times l} \times V \quad \dots (14)$$

V – volumen reakcijske mešanice (ml)

V reakcijskih mešanicah smo vedno uporabili takšen volumen celičnega ekstrakta, da je bila vsebnost proteinov v vzorcu 100 ali 200 μg topnih proteinov. Specifične aktivnosti smo izrazili v U/mg proteinov. Vse pufre in reagente ter zamrznjen celični ekstrakt smo predhodno segreti v vodni kopeli ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.3.6.1 Katalaza

Aktivnost encima katalaza (CAT) smo določevali s pomočjo metode, kjer smo neposredno spremljali razgradnjo H_2O_2 kot spreminjanje absorbance ($\lambda = 240 \text{ nm}$) v določenem časovnem intervalu (Pine in sod., 1984). Aktivnost katalaze smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki razgradi $1 \mu\text{mol } H_2O_2$ v 1 min pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Zmanjševanje absorbance smo merili 3 min v 30-sekundnih intervalih s spektrofotometrom s pomočjo računalniškega programa za nadzor spektrofotometra (Swift-Reaction Kinetics).

Reakcijska mešanica (3 ml) je vsebovala 50 mM vodno raztopino fosfatnega pufru (pH 7), celični ekstrakt in 1 ml 30 mM H_2O_2 v kalijevem fosfatnem pufru, s katerim smo dosegli začetek encimske reakcije. Slepí vzorec ni vseboval celičnega ekstrakta, ampak le 2 ml 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru (pH 7) in 1 ml 30 mM H_2O_2 v kalijevem fosfatnem pufru.

Specifična aktivnost katalaze je podana z naslednjo enačbo:

$$\text{Specifična aktivnost } [U/mg_{\text{proteinov}}] = \frac{\Delta A/\text{min} \times V}{\epsilon \times \text{masa}_{\text{proteinov v vzorcu}} \times l} \quad \dots (15)$$

$\Delta A/\text{min}$ – sprememba absorbance A_{240} na minuto; V- volumen reakcijske mešanice (3 ml); ϵ – molarni ekstincijski koeficient za H_2O_2 ($43,6 \text{ /Mcm}$)

3.3.6.2 Glutation-reduktaza

Metoda za določevanje aktivnosti glutacion-reduktaze (GR) vključuje spremljanje oksidacije NADPH s pomočjo spremljanja absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) v določenem časovnem intervalu (Pinto in sod., 1984). Aktivnost glutacion-reduktaze smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki povzroči oksidacijo $1 \mu\text{mol NADPH}$ v 1 min pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Zmanjševanje absorbance smo merili 3 min v 30-sekundnih intervalih s spektrofotometrom s pomočjo računalniškega programa za nadzor spektrofotometra (Swift-Reaction Kinetics).

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala 100 mM vodno raztopino fosfatnega pufru (pH 7), $100 \mu\text{l}$ 25 mM glutationa v oksidirani obliki, celični ekstrakt, za začetek encimske reakcije pa smo dodali $12,5 \mu\text{l}$ 10 mM NADPH. Slepí vzorec ni vseboval celičnega ekstrakta, namesto tega smo dodali $887,5 \mu\text{l}$ 100 mM vodno raztopino fosfatnega pufru (pH 7). Specifična aktivnost glutacion-reduktaze je podana z enačbo 16.

$$\text{Specifična aktivnost } [U/mg_{\text{proteinov}}] = \frac{\Delta A/\text{min} \times V}{\epsilon \times \text{masa}_{\text{proteinov v vzorcu}} \times l} \quad \dots (16)$$

$\Delta A/\text{min}$ – sprememba absorbance A_{240} na minuto; V- volumen reakcijske mešanice (1 ml); ϵ – molarni ekstincijski koeficient za NADPH ($6,22 \times 10^3 \text{ /Mcm}$)

3.3.6.3 Glutation-peroksidaza

Tako kot pri določevanju aktivnosti glutacion-reduktaze gre tudi pri določevanju aktivnosti glutacion-peroksidaze (GPX) za spremljanje oksidacije NADPH v določenem časovnem intervalu (Lawrence in Burk, 1976). Aktivnost glutacion-peroksidaze smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki povzroči oksidacijo 1 μmol NADPH v 1 min pri 25 °C. Zmanjševanje absorbance smo merili 3 min v 30-sekundnih intervalih s spektrofotometrom s pomočjo računalniškega programa za nadzor spektrofotometra (Swift-Reaction Kinetics).

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala 50 mM vodno raztopino fosfatnega pufru (pH 7), 10 μl 100 mM EDTA, 10 μl 100 mM NaN_3 , 20 μl 10 mM NADPH, 10 μl 0,1 U/ml glutacion-reduktaze, 100 μl 10 mM glutaciona v reducirani obliki, celični ekstrakt ter 25 μl 10 mM vodne raztopine H_2O_2 za začetek encimske reakcije. Slepí vzorec ni vseboval celičnega ekstrakta, ampak smo dodali 825 μl 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru (pH 7). Specifična aktivnost je izračunana s pomočjo enačbe 16.

3.3.6.4 Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza

Za določevanje slednjega encima smo uporabili metodo, ki jo je opisal Postma in sod. (1989), kjer gre za spremljanje redukcije NADP^+ s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 340 nm. Aktivnost glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PDH) smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki povzroči redukcijo 1 μmol NADP^+ v 1 min pri 25 °C. Naraščanje absorbance smo merili 3 min v 30-sekundnih intervalih s spektrofotometrom s pomočjo računalniškega programa za nadzor spektrofotometra (Swift-Reaction Kinetics).

Reakcijska mešanica je vsebovala (1 ml) 50 mM Tris-hidroklorni pufer (pH 8,0), 20 μl 250 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 μl 40 mM NADP^+ in celični ekstrakt. Za začetek encimske reakcije smo dodali 100 μl 50 mM vodne raztopine glukoza-6-fosfat. Slepí vzorec, s katerim smo umerili spektrofotometer, ni vseboval celičnega ekstrakta, temveč 870 μl 50 mM Tris-hidroklornega pufru (pH 8,0). Specifična aktivnost encima je izračunana s pomočjo enačbe 16.

3.3.6.5 Superoksid-dismutaza

Metoda za določevanje aktivnosti citoplazemske Cu in Zn vsebujoče superoksid-dismutaze (Cu,ZnSOD) ter mitohondrijske MnSOD temelji na dejstvu, da oba encima inhibirata redukcijo NBT (NitroBlueTetrazolium) ob prisotnosti superoksidnih anionov. Le-ti se tvorijo ob obsevanju riboflavina s svetlobo, kar nato povzroči redukcijo NBT do modro obarvanega formazana (Ravindranath in Fridovich, 1975).

Reakcijska mešanica (3 ml) je vsebovala 100 μl 1 mM EDTA v 50 mM vodni raztopini fosfatnega pufru, 900 μl 50 mM vodne raztopine fosfatnega pufru (pH 7,8), 100 μl 1 mM NBT, 150 μl 0,1 M metionina, destilirano vodo, celični ekstrakt, za začetek encimske

reakcije pa smo dodali 30 μ l 0,16 mM riboflavina. Slepí vzorec ni vseboval celičnega ekstrakta, dodali smo destilirano vodo (1,72 ml).

Vzorcem smo najprej izmerili absorbanco pri valovni dolžini 550 nm, nato pa jih za 3 min izpostavili obsevanju s 15 W žarnico. Po 3-minutnem obsevanju smo ponovno izmerili absorbanco ($\lambda = 550$ nm).

Skupno aktivnost superoksid-dismutaze smo izrazili v encimskih enotah (U), kjer je 1 U definirana kot količina encima, ki povzroči 50-odstotno inhibicijo redukcijo NBT, kar je podano z enačbo 17.

$$Aktivnost (U) = \frac{1 - \frac{A_{vzorca}}{A_{slepivzorec}}}{0,5} \quad \dots (17)$$

A_{vzorca} – razlika absorbanc ($\lambda = 550$ nm) pred in po 3-minutnem obsevanju s 15 W žarnico; $A_{slepivzorec}$ – absorbanca ($\lambda = 550$ nm) slepega vzorca po 3-minutnem obsevanju; 0,5 – faktor 50-odstotne inhibicije

Ker je Cu,ZnSOD občutljiva na milimolarne koncentracije KCN, mitohondrijska MnSOD pa ne (Ravindranath in Fridovich, 1975), lahko za določevanje aktivnosti MnSOD k reakcijski mešanici, ki je opisana zgoraj, dodamo 30 μ l 0,6 M KCN. Če odštejemo specifično aktivnost MnSOD, od celokupne specifične aktivnosti, dobimo specifično aktivnost Cu,ZnSOD (Pinheiro in sod., 2000). Za izračun aktivnosti MnSOD smo uporabili enačbo 17.

3.3.7 Določevanje vsebnosti glutaciona v reducirani obliki

Uporabili smo metodo, ki sta jo opisala Jamnik in Raspor (2003), kjer se vsebnost glutaciona v reducirani obliki določi spektrofotometrično. Ker 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojska kislina) reagira z –SH skupinami, nastane 2-nitro-5-tiobenzojska kislina oz. anion te kisline, ki je rumene barve in jo lahko kvantitativno ovrednotimo, saj na 1 mol SH nastane 1 mol aniona. Končni pH reakcijske mešanice ob tem ne sme biti pod vrednostjo pH 8, saj intenziteta barve varira, v območju pH 8 do pH 9 pa prihaja do manjših nihanj v intenziteti barve (Sedlak in Lindsay, 1968).

Ker je glutation tripeptid, ki prav tako kot proteini vsebuje SH skupine, je treba najprej izvesti deproteinacijo vzorca, kar dosežemo z dodatkom perklorne kisline (HClO₄). Uporaba le-te ima prednost pred uporabo ostalih kislin v tem, da jo lahko odstranimo z obarjanjem pri nevtralni vrednosti pH kot kalijevo sol in tako ne moti nadaljnjega postopka določevanja glutaciona v reducirani obliki (Akerboom in Sies, 1981).

Odcentrifugirano brozgo, sprano s 15 mM fosfatnim pufrom, smo razredčili v 50 mM vodni raztopini fosfatnega pufr (pH 7) tako, da smo dobili 10-odstotno (w/v) suspenzijo. Dodali smo enak volumen 4 mM EDTA v 2 M HClO₄ in inkubirali na ledu 15 min, da je potekla deproteinacija. Nato smo vzorce centrifugirali (5 min, 4000 vrt./min), supernatant, ki predstavlja kisel ekstrakt, smo prelili v čašo ter čaše postavili na led. Sledila je

nevtralizacija kislega ekstrakta s 3 M KOH do vrednosti pH 8. Vzorce smo ponovno centrifugirali (2 min, 4000 vrt./min), potem pa jih zopet postavili na led, kjer so bili do konca analize. Za določevanje vsebnosti reduciranega glutationa smo uporabili 1 ml ekstrakta, ki smo mu dodali 2 ml 100 mM vodne raztopine fosfatnega puфра (pH 8) in 50 μ l 0,4-odstotnega DTNB v 50 mM vodni raztopini fosfatnega puфра (pH 7). Za slepi vzorec smo namesto vzorca dodali 1 ml nevtralizirane kisline. Po inkubaciji vzorcev na ledu (5 min) smo izmerili absorbanco ($\lambda = 412$ nm) ter izračunali koncentracijo in vsebnost glutationa v μ mol/ g mokre biomase s pomočjo enačb 18 in 19.

$$n_{GSH} = \frac{A_{412}}{\varepsilon \times l} \times V \quad \dots (18)$$

n_{GSH} - množina GSH (mol); A_{412} - absorbanca pri valovni dolžini 412 nm; ε – molarni ekstincijski koeficient (13600/Mcm); R - razredčitev; l - 1 cm; V - volumen reakcijske mešanice

$$\text{vsebnost GSH } (\mu\text{mol/ g mokre biomase}) = \frac{n_{GSH} \times R}{m} \times 10^6 \quad \dots (19)$$

R - razredčitev (V 50 mM fosfatnega puфра + V HClO₄ + V dodanega KOH); m - masa mokre biomase

3.3.8 Statistična obdelava podatkov

Vse meritve zgoraj opisanih metod so bile izvedene v več ponovitvah, rezultati meritev pa so podani kot povprečna vrednost (\bar{X}) s pripadajočim standardnim odklonom (SD) in koeficientom variacije (KV) (enačbe 20, 21, 22), ki smo jih izvedli s pomočjo programa Microsoft Excel.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots (20)$$

n - število meritev; X_i - vrednost i-te meritve

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \dots (21)$$

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \quad \dots (22)$$

Izvedli smo tudi t-test, ki je definiran kot preizkušanje domneve o razliki med povprečjema dveh majhnih neodvisnih vzorcev (kontrolnega in tretiranega). Preizkus temelji na vzorčni porazdelitvi razlik dveh povprečij. Opredelimo dve statistični domnevi, osnovno in ničelno. Osnovna domneva pravi, da se povprečji obeh vzorcev značilno razlikujeta,

ničelna pa, da oba vzorca izvirata iz iste populacije in da ni resnične razlike med obema povprečjema. Domnevo preverjamo z izračunom verjetnosti, da bi dobili razliko med povprečjema obeh vzorcev, ki bi jo dobili le, če bi bila vzorca vzeta iz iste populacije. Če je ta verjetnost manjša kot stopnja tveganja, za katero se odločimo, zavrnemo ničelno domnevo v korist osnovne. Pomagamo si s primerjavo kritične vrednosti t (tabelarna vrednost) pri dvosmernem testu ob tveganju p in m stopinjah prostosti ter izračunane t vrednosti. Najpogosteje so zgornje meje tveganja p 0,05; 0,01 ali 0,001, ki jih lahko opišemo tudi kot 5-, 1- ali 0,1-odstotna stopnja značilnosti rezultatov. Pri obdelavi rezultatov smo uporabili zgornjo mejo tveganja $p \leq 0,01$ ali $p \leq 0,001$ tako, da lahko z več kot 99- ali 99,9-odstotno verjetnostjo trdimo, da se povprečji obeh vzorcev statistično značilno razlikujeta (Adamič, 1989; Košmelj, 2001).

4 REZULTATI

Na podlagi delovne hipoteze, da je toksičnost selena(VI) povezana s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki naj bi nastajali med redukcijskimi procesi selena(VI) in da nastanek ROS posledično inducira antioksidativne obrambne sisteme kvasovk ter tako posredno vpliva na odpornost kvasovk na selen(VI), smo skušali ugotoviti vlogo antioksidativnih obrambnih sistemov kvasovk pri odpornosti na selen(VI).

Dva seva kvasovke *Schizosaccharomyces pombe*, na selen odporni in na selena občutljivi sev, smo izpostavili različnim koncentracijam selena(VI). Določili smo vpliv selena(VI) na rast obeh sevov kvasovke *S. pombe*, kondicijo celic, znotrajcelično oksidacijo, aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema in znotrajcelično vsebnost reduciranega glutationa (GSH) v sredini eksponentne fazi rasti, kjer smo vedno opravili najmanj dve meritvi pri dveh kultivacijah.

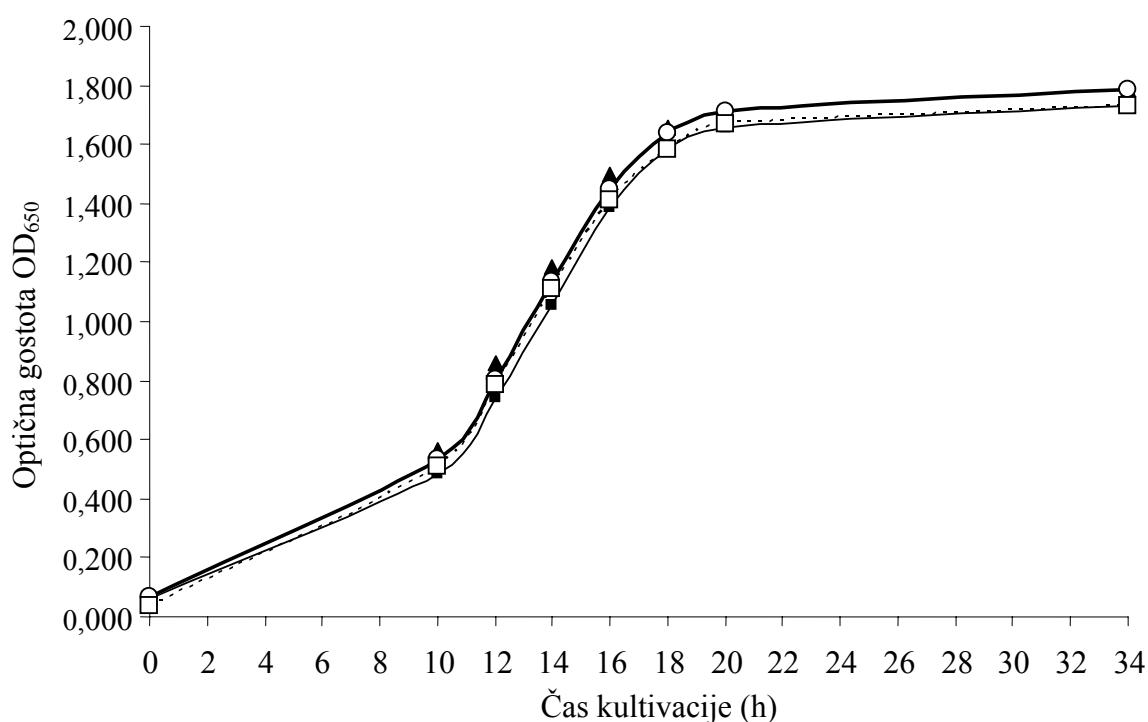
V nadaljevanju so predstavljeni rezultati pridobljeni v času od 21. novembra 2005 do 26. aprila 2006, ko je bilo opravljenih 630 ur laboratorijskega dela.

4.1 VPLIV SELENA(VI) NA RAST, KONDICIJO IN ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO CELIC KVASOVKE *Schizosaccharomyces pombe*

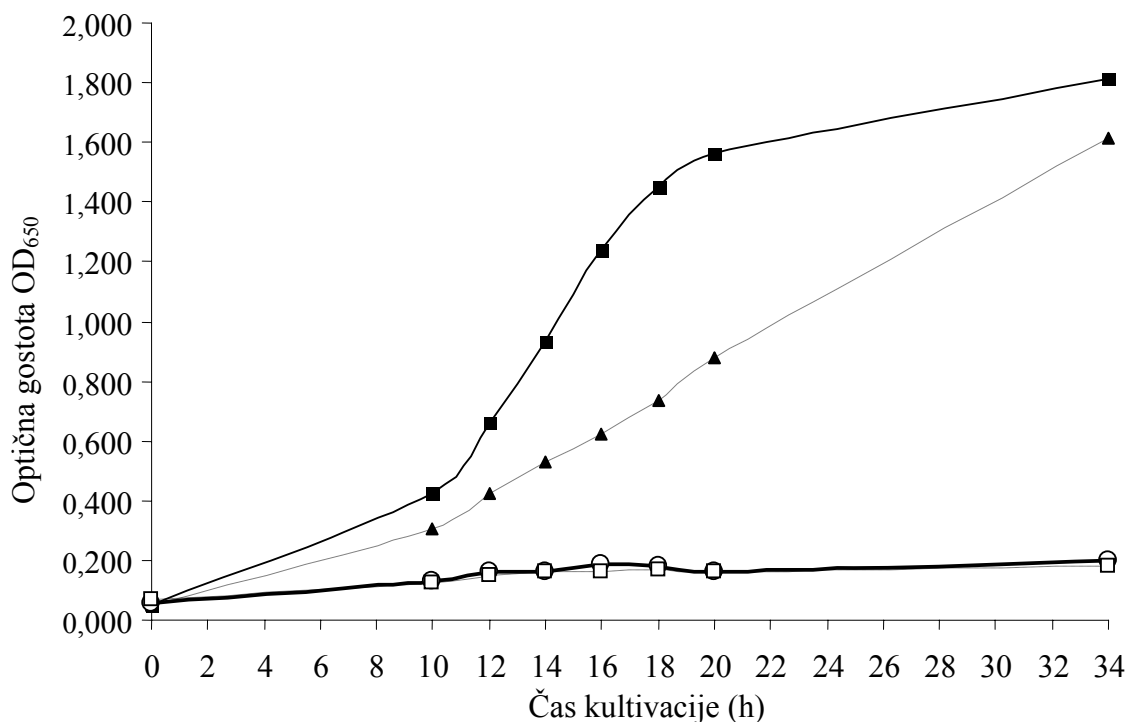
Z gojenjem kvasovk v aerobnih pogojih smo določili vpliv treh (0,04, 0,4 in 4 mM) koncentracij selena(VI) na rast, kondicijo celic (skupno število celic, število kolonijskih enot, relativna živost) in znotrajcelično oksidacijo dveh sevov kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), in sicer *S. pombe* ZIM 1889, na selen(VI) odporni sev (Se^R) in *S. pombe* ZIM 1878, na selen(VI) občutljivi sev (Se^S).

4.1.1 Vpliv selena(VI) na rast

Sliki 5 in 6 prikazujeta vpliv treh koncentracij selena(VI) na rast kvasovke *S. pombe*, kjer smo v gojišče YEPD-bujon na začetku kultivacije dodali vodno raztopino selena(VI) do končnih koncentracij 0,04, 0,4 in 4 mM v gojišču.



Slika 5: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na rast kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) v stresani kulturi (YEPD gojišče, $t = 34$ h, $T = 28$ °C, 200 vrt./min); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev dveh neodvisnih gojitev, KV je podan v Prilogi C1-C4. Opombe črtnega grafikona: kontrola -■-, 0,04 mM -▲-, 0,4 mM -○-, 4 mM -◻-



Slika 6: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na rast kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) v stresani kulturi (YEPD gojišče, $t = 34$ h, $T = 28$ °C, 200 vrt./min); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev dveh neodvisnih gojitev, KV je podan v Prilogi C5-C8. Opombe črtnega grafikona: kontrola -■-, 0,04 mM -▲-, 0,4 mM -○-, 4 mM -□-

Iz dobljenih rastijskih krivulj smo kulturam določili sredino eksponentne faze rasti kvasovke *S. pombe*, saj smo vzorcem v sredini eksponentne faze določevali število kolonijjskih enot, relativno živost, vsebnost glutaciona ter pripravili celični ekstrakt, ki smo ga uporabili za določevanje aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema.

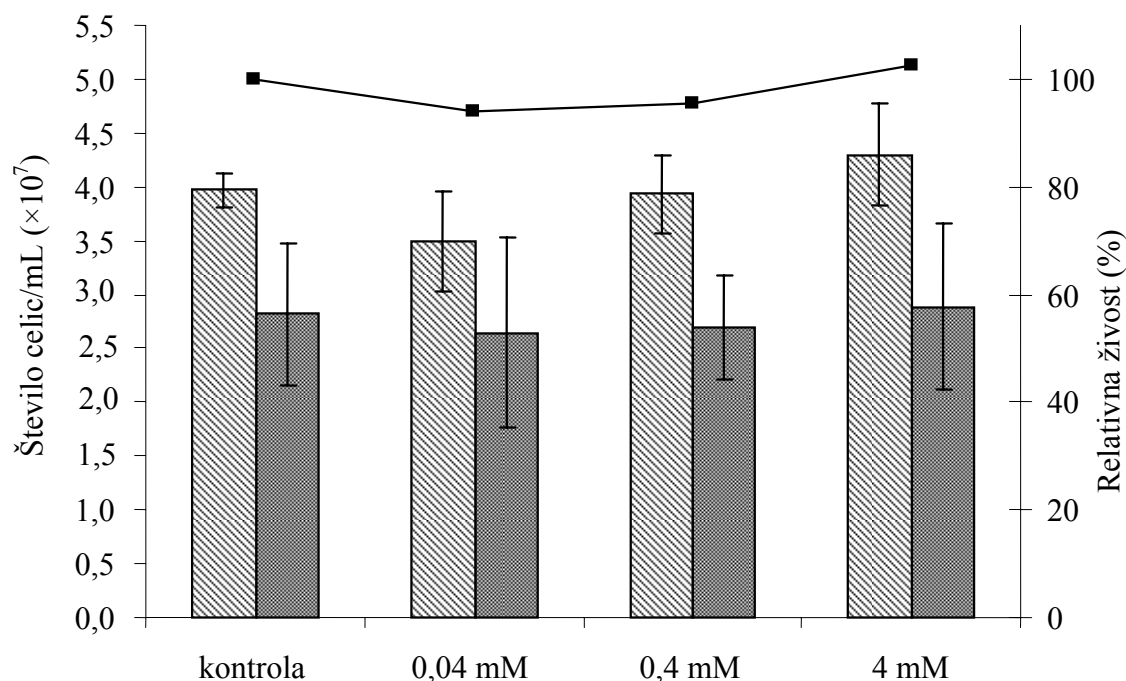
Pri na selen(VI) odpornemu sevu kvasovke *S. pombe* selen(VI) nima bistvenega vpliva na rast, saj so razlike med kontrolnim vzorcem in vzorci z dodanim selenom(VI) v gojišče statistično ne razlikujejo (Slika 5). Nasprotno se kaže pri na selen(VI) občutljivemu sevu (Slika 6), kjer je med vzorci prišlo do velikih razlik. Najmanjši inhibitorni učinek na rast ima 0,04 mM koncentracija selena(VI) v gojišču, saj se rast zmanjša za 28 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem ob koncu faze prilaganja (Slika 6, $t = 10$ h). Nato se rast še dodatno zmanjša (za 44 % ob $t = 14$ h in 20 h), saj je faza eksponentne rasti močno inhibirana, vendar kljub temu doseže stacionarno fazo rasti. Pri 0,4 mM ter 4 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču pa je razviden močan inhibitorni učinek selena(VI) na rast kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}). Med izmerjeno optično gostoto ($\lambda = 650$ nm) ob inokulaciji in času $t = 34$ h je le 3,4- in 2,7-kratno povečanje optične gostote pri koncentracijah selena(VI) 0,4 in 4 mM v gojišču (Slika 6). Iz tega lahko sklepamo na toksičnost selena(VI) pri koncentracijah 0,4 in 4 mM, ki popolnoma prepreči rast na selen(VI) občutljivega seva kvasovke *S. pombe*.

4.1.2 Vpliv selena(VI) na kondicijo celic

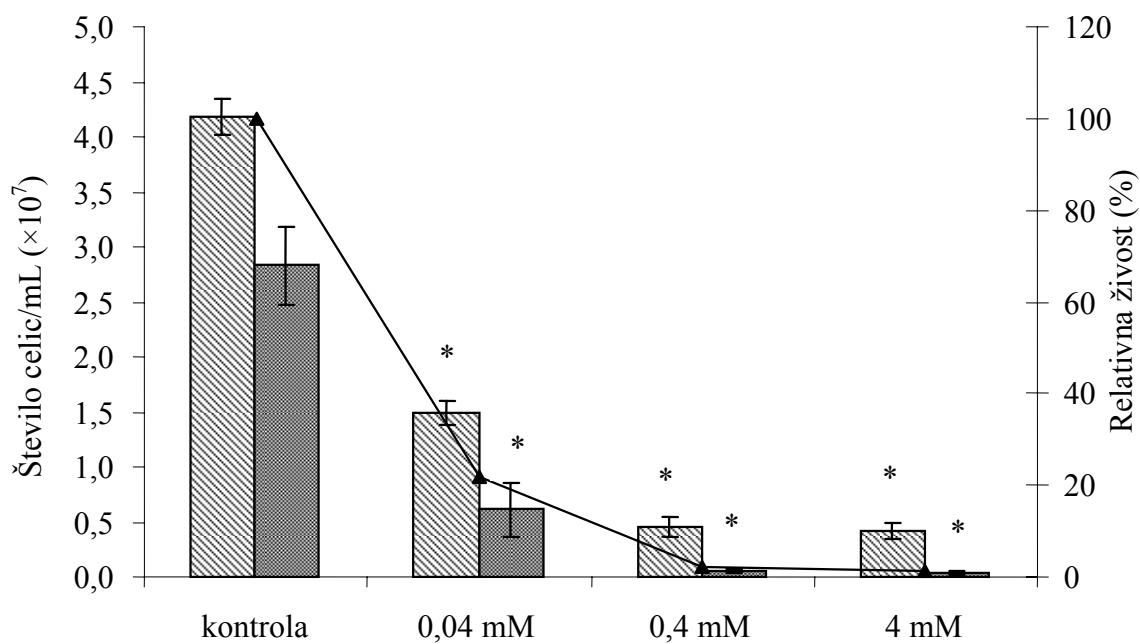
V sredini eksponentne faze rasti smo preučili vpliv selena(VI) na kondicijo celic. Pri na selen(VI) odpornemu sevu se skupno število celic in število kolonijskih enot (KE) (Slika 7) med kontrolnim vzorcem ter pri vzorcih z različnimi koncentracijami selena(VI) ne razlikuje bistveno. Posledično se tudi vrednosti relativne živosti pri kontrolnem in tretiranih vzorcih gibljejo med 96 in 103 %.

Močan toksični učinek selena(VI) pa je razviden iz Slike 8, kjer so podani rezultati za na selen(VI) občutljiv sev. Živih celic v primerjavi s kontrolo je že pri najmanjši (0,04 mM) dodani koncentraciji selena(VI) v gojišče za 2,7-krat manj. Še močnejši toksičen učinek pa imata koncentraciji 0,4 mM ter 4 mM, saj pride do 44-kratnega zmanjšanja v številu KE pri 0,4 mM ter do 65-kratnega pri 4 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču v primerjavi s kontrolo.

Skupno število celic je pri obeh sevih (Slika 7 in 8) večje kot pa število živih, razmnoževanja sposobnih celic, kar je podano s številom KE.

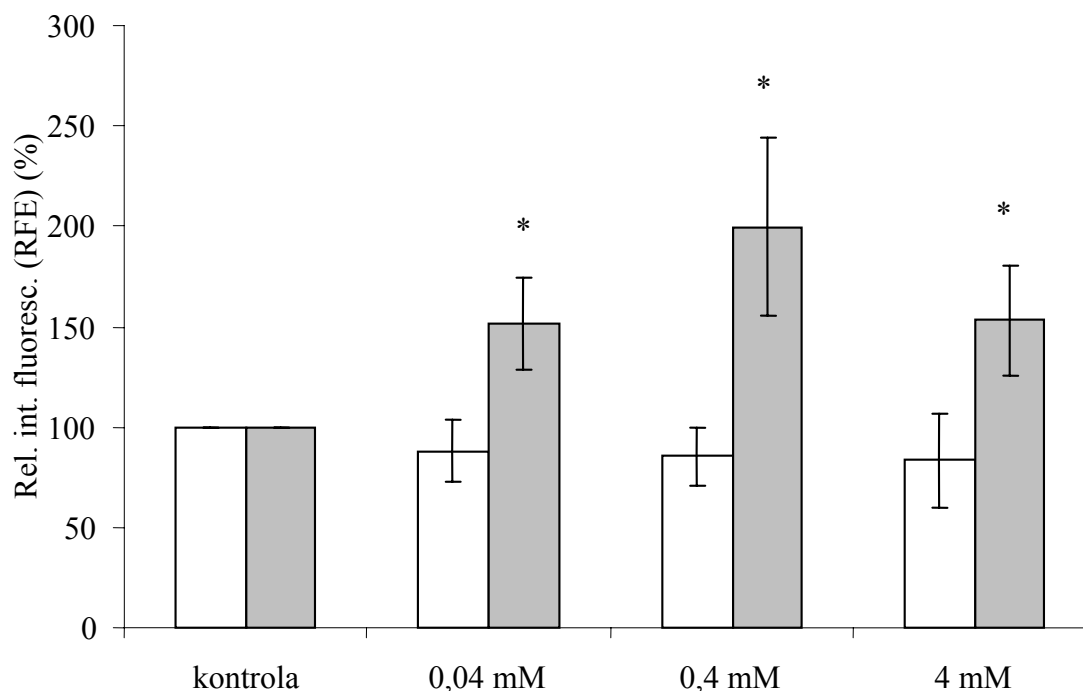


Slika 7: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na kondicijo celic stresane kulture (YEPD gojišče, T = 28 °C, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) v sredini eksponentne faze rasti; (skupno število celic (stolpčni grafikon, ▨), število kolonijskih enot (KE) (stolpčni grafikon, ■) in relativno živost kvasovke (črtni grafikon, -■-)); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev \pm SD dveh neodvisnih gojitev.



Slika 8: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na kondicijo celic stresane kulture (gojišče YEPD, T = 28 °C, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) v sredini eksponentne faze rasti; (skupno število celic (stolpčni grafikon, ▨), število kolonij (KE) (stolpčni grafikon, ■) in relativno živost kvasovke (črtni grafikon, -■-)); rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih meritev \pm SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - $p < 0,001$

4.1.3 Vpliv selen(VI) na znotrajcelično oksidacijo



Slika 9: Vpliv treh koncentracij selen(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na relativno intenziteto fluorescence (RFE) izražene v odstotkih stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikoni, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikoni, ■) v sredini eksponentne faze rasti; rezultati so podani kot povprečje šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001

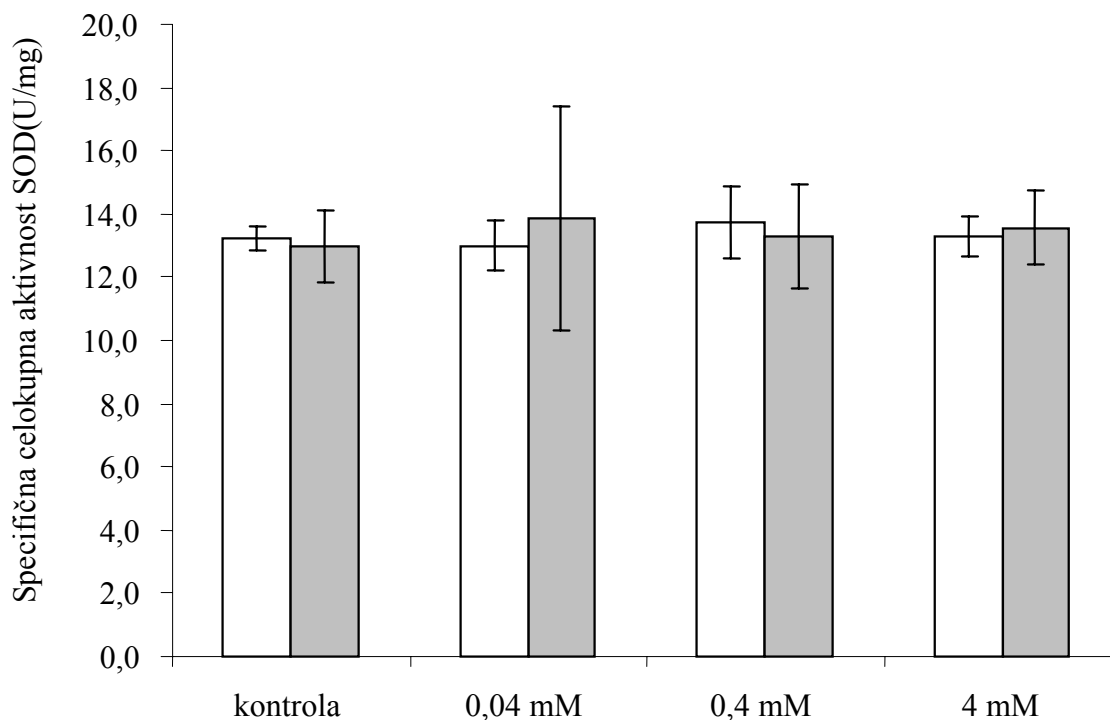
Selen(VI) povzroči povečano znotrajcelično oksidacijo pri na selen(VI) občutljivemu sevu, medtem ko pri na selen(VI) odpornemu sevu ni prišlo do statistično značilnih razlik v znotrajcelični oksidaciji (Slika 9). Zato pri na selen(VI) občutljivemu sevu pričakujemo povečano aktivnost antioksidativnih obrambnih sistemov.

4.2 VPLIV SELENA(VI) NA ANTIOKSIDATIVNE OBRAMBE SISTEME KVASOVKE *Schizosaccharomyces pombe*

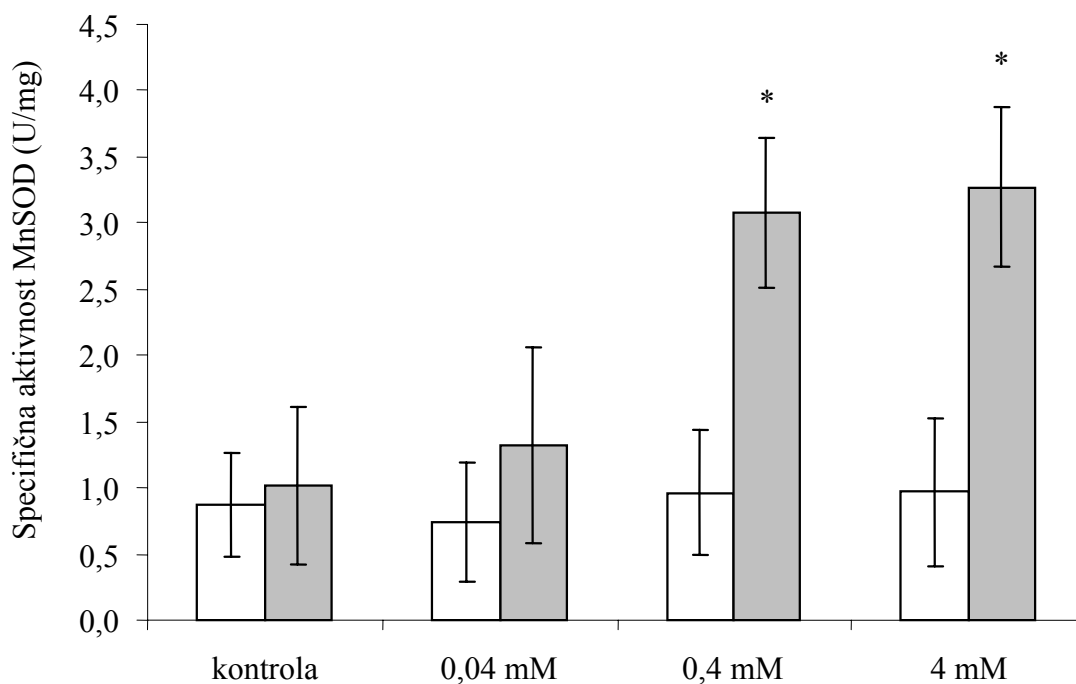
Vse aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema so bile izmerjene v celičnih ekstraktih, pridobljenih iz stresanih kultur (YEPD gojišče, $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^{R}) in ZIM 1878 (Se^{S}) v sredini eksponentne faze rasti. Vsebnost glutationa v reducirani obliki je bila prav tako izmerjena v sredini eksponentne faze rasti v suspenziji celic pripravljenih po navodilih opisanih v Metodah dela.

4.2.1 Vpliv selena(VI) na aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema

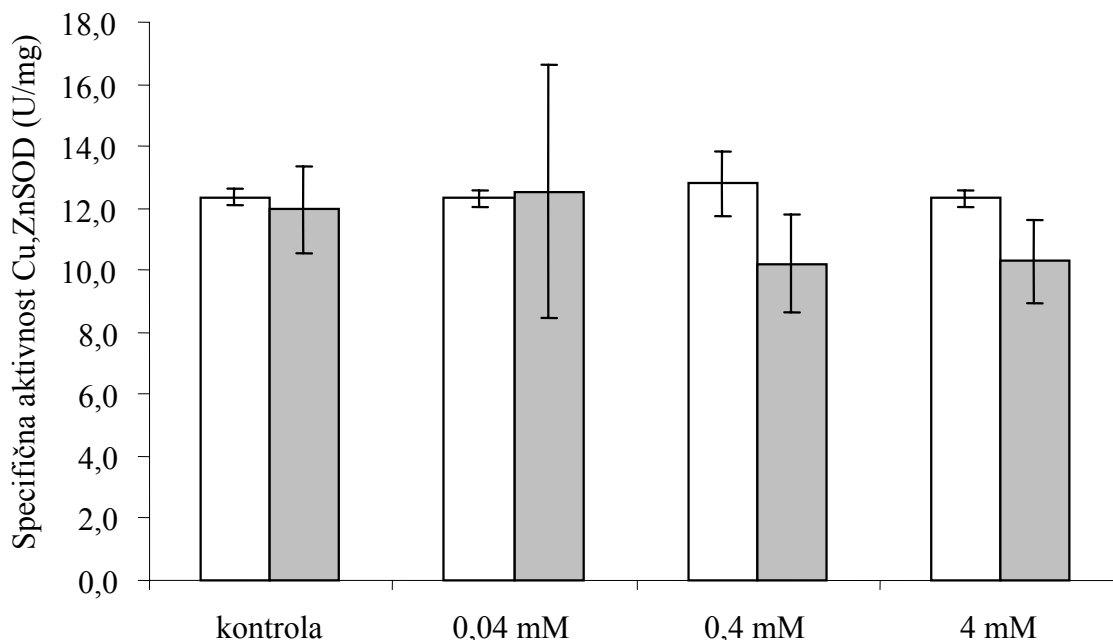
4.2.1.1 Aktivnost superoksid-dismutaz



Slika 10: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično celokupno aktivnost encima superoksid-dismutaza (SOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^{R}) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^{S}) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponentne faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev \pm SD dveh neodvisnih gojitev



Slika 11: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično aktivnost encima Mn-vsebujoče superoksid-dismutaze (MnSOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001

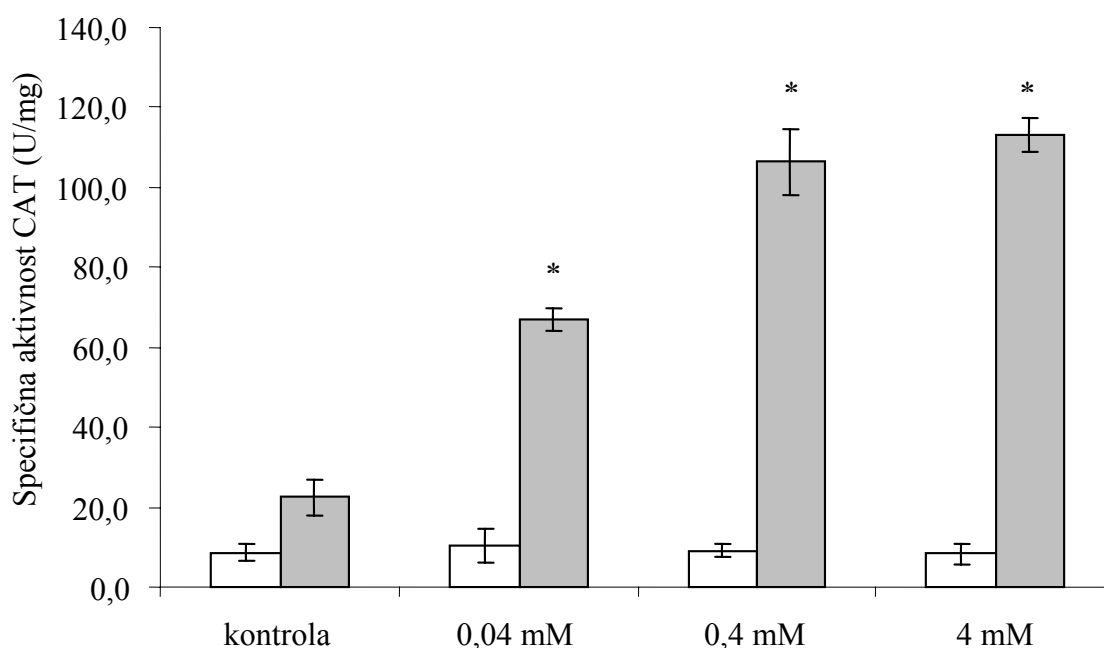


Slika 12: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično aktivnost encima Cu,Zn-vsebujoče superoksid-dismutaze (Cu,ZnSOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev

Na Slikah 10, 11 in 12 je prikazan vpliv selena(VI) na celokupno specifično aktivnost superoksid-dismutaze (SOD), Mn- in Cu,Zn-vsebujoče SOD. Celokupna specifična aktivnost SOD se pri obeh sevih, tako na selen(VI) odpornemu kot na selen(VI) občutljivemu sevu, pri različnih koncentracijah selena(VI) ne spremeni bistveno (Slika 10). Do razlik med sevoma ni prišlo tudi pri specifični aktivnosti encima Cu,ZnSOD (Slika 12). Specifična aktivnost mitohondrijske MnSOD je nespremenjena pri sevu ZIM 1889 (Se^R), pri sevu ZIM 1878 (Se^S) pa pride do povišanja specifične aktivnosti pri 0,4 in 4 mM koncentraciji dodanega selena(VI) v gojišču za 3,1- in 3,3-krat v primerjavi s kontrolo (Slika 11).

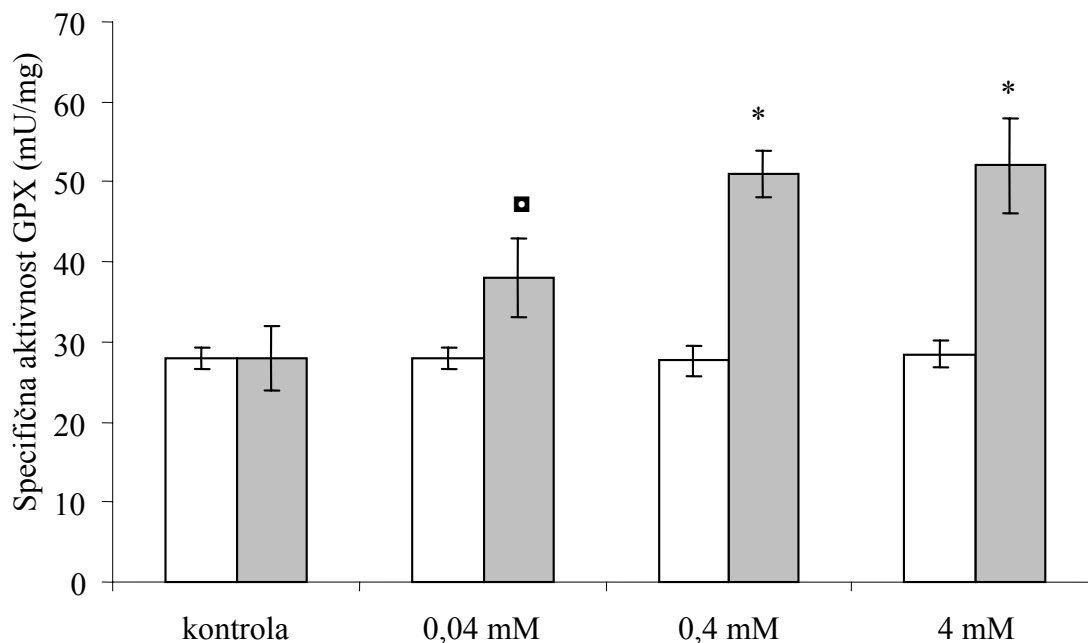
4.2.1.2 Aktivnost katalaze

Specifična aktivnost katalaze (CAT), ki odstranjuje vodikov peroksid, je ostala nespremenjena pri na selen(VI) odpornemu sevu. Velik vpliv pa ima dodatek selena(VI) pri sevu ZIM 1878 (Se^S), kjer je iz Slike 13 razvidno bistveno povečanje specifične aktivnosti CAT. Pri 4 mM koncentraciji selena(VI) je opazna največja aktivnost encima, saj je dosežena vrednost 113,0 U/mg, kar je 5-krat več v primerjavi s kontrolo. Nekaj manjša (4,7-krat) je aktivnost pri 0,4 mM koncentraciji, najmanjše povečanje v primerjavi s kontrolo na selen(VI) občutljivega seva pa je doseženo pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI) dodanega v gojišče. To kaže na občutno povečanje tvorbe vodikovega peroksida pri sevu ZIM 1878 (Se^S).

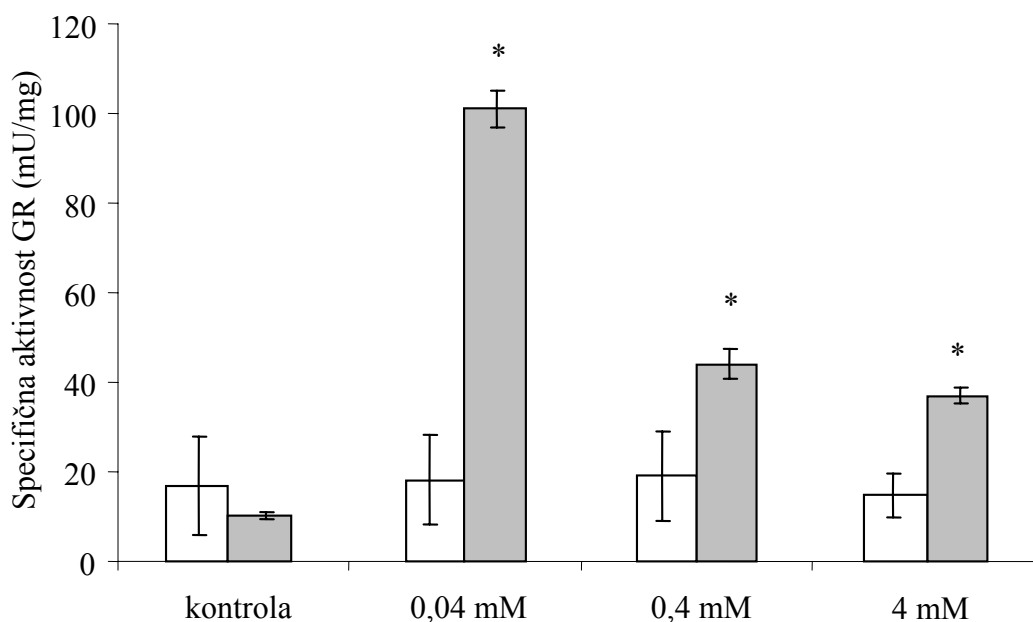


Slika 13: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično aktivnost encima katalaze (CAT) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opmomba: * - p < 0,001

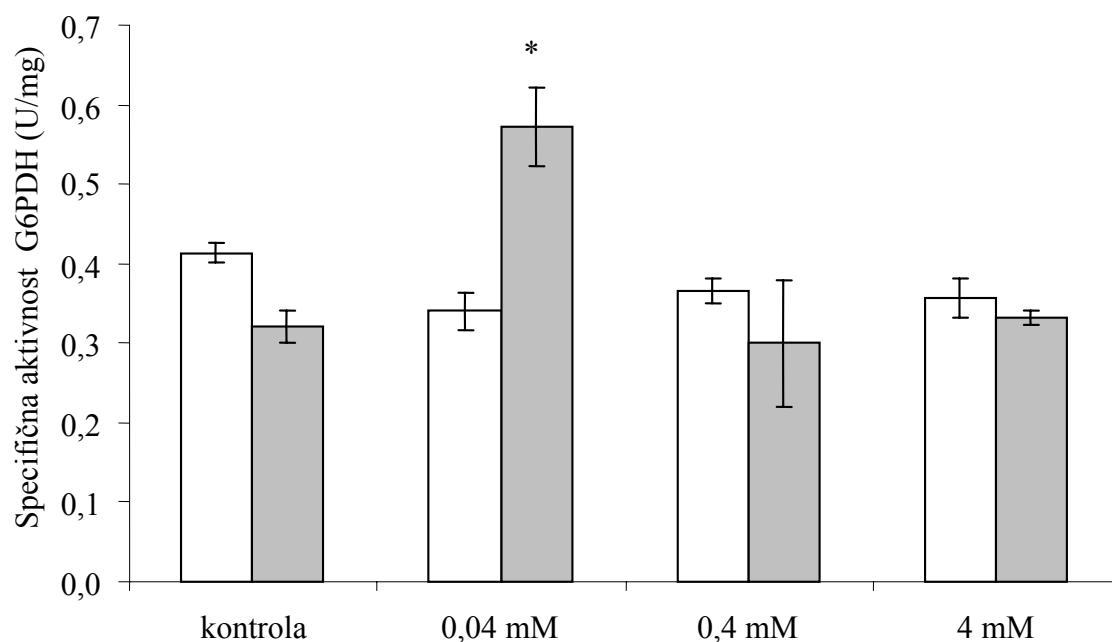
4.2.1.3 Glutation-peroksidaza, glutacion-reduktaza in glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza



Slika 14: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično aktivnost encima glutation-peroksidaza (GPX) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: ■ - p < 0,01, * - p < 0,001



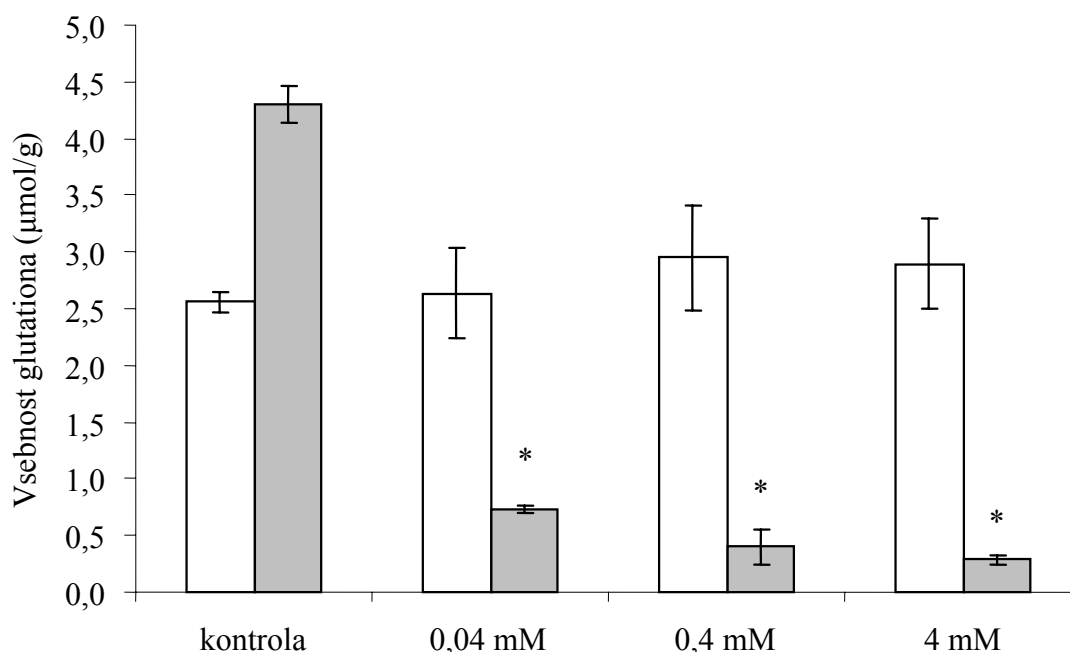
Slika 15: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično aktivnost encima glutacion-reduktaza (GR) v celičnem ekstraktu stresane kulture kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001



Slika 16: Vpliv treh koncentracij selen(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na specifično aktivnost encima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost šestih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001

Pri sevu ZIM 1889 (Se^R) je specifična aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) neodvisna od koncentracije selen(VI), prav tako velja za encima glutation-reduktaza (GR) in glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH) (Slika 14, 15, 16). Nasprotno pa se kaže pri na selen(VI) občutljivemu sevu, kjer specifična aktivnost GPX narašča v primerjavi s kontrolo, saj sta specifični aktivnosti pri 0,4 in 4 mM selen(VI) v gojišču največji. To nakazuje na povečano koncentracijo vodikovega peroksida ter povečano koncentracijo oksidirane glutationa (GSSG) v celici. Specifična aktivnost GR se v odvisnosti od povečevanja koncentracije selen(VI) dodanega v gojišče zmanjšuje, pri encimu G6PDH pa se specifična aktivnost poveča le pri 0,04 mM koncentraciji dodanega selen(VI) v gojišče (Slika 15, 16).

4.2.2 Vpliv selena(VI) na vsebnost glutaciona v reducirani obliki



Slika 17: Vpliv treh koncentracij selena(VI) (0,04, 0,4 in 4 mM) na vsebnost glutaciona v reducirani obliki pri stresani kulturi (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* sev ZIM 1889 (Se^R) (stolpčni grafikon, □) ter ZIM 1878 (Se^S) (stolpčni grafikon, ■) v sredini eksponente faze rasti; rezultati so podani kot povprečna vrednost osmih meritev ± SD dveh neodvisnih gojitev. Opomba: * - p < 0,001

Kot je razvidno iz Slik 14 in 15 selen(VI) nima vpliva na aktivnosti encimov GPX ter GR pri sevu ZIM 1889 (Se^R), ki imata vlogo ohranjanja oksidirane in reducirane oblike glutaciona v ravnovesju. Z določevanjem glutaciona v reducirani obliki (GSH) smo še dodatno dokazali nespremenjeno delovanje GR in GPX pri vzorcih z dodani selenom(VI) v gojišču, saj se vsebnost GSH pri različnih koncentracijah selena(VI) v gojišču med vzorci ne razlikuje. Do občutnega zmanjševanja v primerjavi s kontrolo pa pride pri na selen(VI) občutljivemu sevu, kjer večje koncentracije selena(VI) povzročijo manjše vsebnosti GSH. Vsebnost GSH pri 4 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču je kar 14-krat manjša, pri vzorcu s 0,4 mM koncentracijo selena(VI) v gojišču pa 11-krat manjša v primerjavi s kontrolo (Slika 17).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Zaradi predvidevanj, da prihaja ob redukciji selena(VI) do nastanka ROS, ki lahko povzročijo oksidativni stres, je bila postavljena delovna hipoteza, da je toksičnost selena(VI) povezana s tvorbo ROS, ki so posledica redukcijskega procesa selena(VI), nastanek ROS pa inducira antioksidativne obrambne sisteme kvasovk in tako posredno vpliva na odpornost kvasovk na selen(VI). Zato smo želeli ugotoviti vpliv selena(VI) na antioksidativne obrambne sisteme kvasovk pri odpornosti na selen(VI).

5.1 RAZPRAVA

Selen, ki je pomemben kot mikroelement, lahko pri večjih koncentracijah postane toksičen. Toksičnost selena naj bi bila povezana s tvorbo ROS med redukcijskimi procesi po vstopu v celico, za kar je potreben aktiven encim ATP-sulfurilaza, ki omogoči aktivacijo selena(VI) v APSe ter redukcijo do selena(IV). Če pride do povečanega nastanka ROS, se poveča aktivnost antioksidativnih obrambnih sistemov, ti pa zaščitijo celico pred morebitnimi poškodbami, ki jih lahko izzovejo ROS, hkrati pa omogočijo preživetje celice (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003).

Zato smo preučili vpliv selena(VI) na rast, kondicijo celic, znotrajcelično oksidacijo in antioksidativne obrambne sisteme dveh sevov kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) in sicer: sev ZIM 1889, na selen(VI) odporni sev (Se^R) in sev ZIM 1878, na selen(VI) občutljivi sev (Se^S).

5.1.1 Vpliv selena(VI) na rast, kondicijo celic in oceno znotrajcelične oksidacije kvasovke *Schizosaccharomyces pombe*

Z dodajanjem selena(VI) do končnih koncentracij 0,04, 0,4 in 4 mM v gojišče smo želeli preučiti vpliv le-tega na rast, kondicijo celic in znotrajcelično oksidacijo dveh sevov kvasovke *S. pombe*, na selen(VI) odporni in na selen(VI) občutljivi sev.

5.1.1.1 Na selen(VI) odporni sev kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R)

Kot že opisano, sev ZIM 1889 (Se^R) nima aktivnega encima ATP-sulfurilaza, ki bi omogočal aktivacijo selena(VI) in s tem nadaljnjo redukcijo, kjer naj bi prihajalo do tvorbe ROS (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003). To bi lahko povzročilo oksidativni stres in posledično zmanjšano rast kvasovke. Zato ni pričakovati vpliva selena(VI) na rast, kar je tudi razvidno iz Slike 5. Prav tako ni prišlo do sprememb med vzorci v številu kolonijskih enot (KE), ki zajema le žive celice, sposobne razmnoževanja, ter v skupnem številu celic (Slika 7). Dodajanje selena(VI) v gojišče ni privedlo niti do povečane znotrajcelične oksidacije, kar je še dodaten dokaz, da do povečanega nastanka ROS, ki bi povzročili oksidativni stres, zaradi prisotnosti selena(VI) ne pride (Slika 9). Zato tudi ni pričakovati povečanih aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema, kar rezultati tudi potrjujejo (Slike 10-16).

Dokaz, da je za redukcijo selen(VI) potrebna aktivna ATP-sulfurilaza in da sama prisotnost selen(VI) v celici ne povzroči oksidativnega stresa, je raziskava, kjer so ugotavljali bioakumulacijo selen v celicah kvasovke *S. pombe*. Na selen(VI) odporni sev kvasovke je vseboval 10-krat več akumuliranega selen kot na selen(VI) občutljivi sev pri 4 mM koncentraciji selen(VI) dodanega v gojišče. Kljub temu je bila rast na selen(VI) odpornega seva pri 4 mM koncentraciji selen(VI) dodanega v gojišče nespremenjena v primerjavi s kontrolo, saj ni prišlo do redukcije do selen(IV), ki je za celice toksičen. Toksičnost selen(IV) je bila še dodatno dokazana z dodajanjem selen(IV) v gojišče tako pri na selen(VI) odpornemu kot občutljivemu sevu, kjer je selen(IV) povzročil inhibicijo rasti obeh sevov. Do razlik med sevoma pa ni prišlo niti v bioakumulaciji selen, če je bil v gojišče namesto selen(VI) dodan selen(IV) (Raspor in sod., 2003).

ATP-sulfurilaza pa ni pomembna le zaradi redukcije selen(VI), ampak je tudi stopnja, ki omejuje hitrost pri prevzemu in asimilaciji selen(VI) (Pilon-Smits in sod, 1999).

5.1.1.2 Na selen(VI) občutljivi sev kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S)

Pri kvasovki vrste *S. pombe* ZIM 1878 (Se^S) je dodatek selen(VI) inhibitorno deloval na rast celice, kar je razvidno tudi iz rezultatov (Slika 6). 0,04 mM koncentracija selen(VI) dodanega v gojišče deluje inhibitorno na rast, 0,4 in 4 mM koncentracija selen(VI) pa popolnoma inhibira rast na selen(VI) občutljivega seva. Enaki učinki dodanega selen(VI) v gojišče pri kvasovki *S. pombe* so bili dobljeni pri raziskavi, ki so jo opravili Raspor in sod. (2003).

Posledično je zmanjšano tudi skupno število celic ter število KE pri 0,4 in 4 mM koncentraciji dodanega selen(VI) v gojišče (Slika 8), relativna živost pa je pri obeh koncentracijah selen(VI) zmanjšana na 2 odstotka. Dobljeni rezultati potrjujejo toksičnost selen(VI) pri večjih koncentracijah (0,4 in 4 mM) ter zmanjšano rast v primerjavi s kontrolo pri manjših koncentracijah (0,04 mM). Tako skupno število celic, kjer so upoštevane tako žive kot mrtve celice, kot število KE, ki zajema le celice sposobne razmnoževanja, se z večanjem koncentracije dodanega selen(VI) v gojišče zmanjšuje. Skupno število poleg celic sposobnih razmnoževanja predstavlja tudi tiste celice, kjer posledice redukcije selen(VI) in oksidativnega stresa preprečijo razmnoževanje celice, saj je znano, da selen(IV) povzroči inhibicijo α -DNA-polimeraze (Bronzetti in sod., 2001). Poleg tega je lahko učinkovitost antioksidativnih obrambnih sistemov med oksidativnim stresom zmanjšana zaradi prevelike vsebnosti ROS, ki jih antioksidativni obrambni sistemi ne zmorejo odstraniti. ROS pa lahko povzročijo poškodbe makromolekul in vodijo v smrt celice. Nežive celice prav tako privedejo k večji optični gostoti, zato je tudi skupno število celic pri vseh vzorcih večje kot število KE (Slika 8). Vendar razlika med skupnim številom celic in številom KE ni nujno posledica le oksidativnega stresa, lahko pa dodatno pripomore k večji razliki. To je razvidno tudi iz Slike 7, saj pri na selen(VI) odpornem sevu do oksidativnega stresa ni prišlo (Slika 9), zato je razlika med skupnim številom celic in številom KE pri vseh vzorcih podobna in ne prihaja do razlik med vrednostima (Slika 7). Vrednost števila KE je pri vseh vzorcih približno 70 odstotkov vrednosti skupnega števila celic, enako velja za kontrolni vzorec pri na selen(VI) občutljivemu sevu (Slika 7 in 8).

Kar 44-kratno ter 65-kratno zmanjšanje živih, razmnoževanja sposobnih celic (število KE) pri 0,4 mM in 4 mM koncentraciji selena(VI) pri sevu ZIM 1878 (Se^{S}) je tako v največji meri posledica oksidativnega stresa in premajhne učinkovitosti antioksidativnih obrambnih sistemov odstranjevanja ROS, ki so nastali med redukcijo selena(VI), kar je omogočeno zaradi aktivne ATP-sulfurilaze (Raspor in sod., 2003).

Toksičnost selena(VI) je povezana s sposobnostjo poteka njegove redukcije, kar omogočajo aktivni encimi asimilacijske poti sulfata, ki je potrebna tudi za redukcijo selena(VI) (Dilworth in Bandurski, 1977). Pri na selen(VI) občutljivemu sevu kvasovke *S. pombe* je do redukcije selena(VI) lahko prišlo, saj ima sev aktivno encim ATP-sulfurilaza, ki omogoča aktivacijo selena(VI) in njegovo nadaljnjo redukcijo. Vzrok toksičnosti naj bi bil nastanek ROS med redukcijskimi procesi (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003), kar bi lahko povzročilo večjo umrljivost med celicami kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}). Povečana znotrajcelična vsebnost ROS povzroči oksidativni stres, ki ga lahko zaznamo z dodatkom barvila H_2DCF , kar smo med eksperimentalnim delom tudi izvedli. Iz Slike 9 je razvidno, da je dodatek 0,04, 0,4 in 4 mM koncentracije selena(VI) v gojišče povzročil povečano znotrajcelično oksidacijo v primerjavi s kontrolnim vzorcem, kar nakazuje na nastanek ROS med redukcijskimi procesi selena(VI). Redukcija selena(VI) pri sevu ZIM 1878 (Se^{S}) je omogočena zaradi aktivnega encima ATP-sulfurilaza.

Poleg tega je dodaten razlog zmanjšanja rasti in kondicije celic pri na selen(VI) občutljivemu sevu lahko tudi zakisanje rastnega medija in pomanjkanje znotrajceličnega ATP ter posledično tudi znotrajcelično zakisanje (Fujs, 2004). Ker poteka prenos selena(VI) v celico s kotransportom protonov, kjer se z eno molekulo selena(VI) prenesejo še trije vodikovi protoni (H^+) (Mendoza-Cózatl in sod., 2005), pride do povečane vsebnosti H^+ ionov v celici. Celice morajo zagotoviti fiziološko znotrajcelično vrednost pH s pomočjo encima H^+ -ATPaze v citoplazemski membrani, ki s pomočjo hidrolize ATP črpa H^+ ione iz celice (Holyoak in sod., 1996). ATP pa je potreben tudi za transport selena(VI) v celico in za redukcijo selena(VI) (Slika 1 in 2). Ker je bila bioakumulacija selena večja pri večjih koncentracijah selena(VI) dodanega v gojišče, se je posledično večala tudi poraba ATP z večanjem koncentracije selena(VI). Tako celice ne morejo več zagotoviti dovolj ATP potrebne za izčrpavanje H^+ ionov, saj se porablja za transport ter redukcijo selena(VI), kar vodi do znotrajceličnega zakisanja (Fujs, 2004).

Posledica toksičnosti selena(IV) pri kvasovki *S. cerevisiae* v eksponentni fazi rasti je povezana tudi z genotoksičnostjo, vendar ima pomembno vlogo koncentracija selena(IV) (Bronzetti in sod., 2001). Že 1 μM koncentracije dodanega selena(IV) povzročijo točkovne mutacije in genske konverzije. Prav tako pa pride do kar 70-odstotnega zmanjšanja rasti v primerjavi s kontrolo. Raziskave s tkivnimi kulturami, kjer so bile uporabljene celične linije vrsta HeLa, pa so pokazale, da je toksičnost selena povezana z zaustavitvijo DNA sinteze zaradi inhibicije α -DNA-polimeraze (Bronzetti in sod., 2001). Mutacije so lahko posledica nezadostnega odstranjevanja ROS s strani encimov antioksidativnega obrambnega sistema, saj je znano, da ROS lahko povzročijo spremembe v strukturi DNA, ki privedejo do napak med podvojevanjem DNA, le-te pa so vzrok mutacij (Matés in Sánchez-Jiménez, 2000).

Hkrati pa selen(IV) v manjših koncentracijah lahko deluje antimutageno. Če so bile celice kvasovke *S. cerevisiae* izpostavljene 400 mM koncentracijam vodikovega peroksida, je leta deloval genotoksično. Ob dodatku 0,01, 0,1 ali 0,5 μ M selena(IV) pa se je učinek genotoksičnosti vodikovega peroksida zmanjšal (Bronzetti in sod., 2001).

Glede na rezultate vpliva selena(VI) na rast, kondicijo celic in znotrajcelično oksidacijo seva ZIM 1878 (Se^S) lahko sklepamo na povečano aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema ter zmanjšano vsebnost glutaciona v reducirani obliki pri na selen(VI) občutljivemu sevu.

5.1.2 Vpliv selena(VI) na antioksidativne obrambne sisteme kvasovke *Schizosaccharomyces pombe*

V Preglednici 3 so zaradi lažjega pregleda povzeti rezultati antioksidativnih obrambnih sistemov pri na selen(VI) odpornemu sevu (Se^R) ter na selen(VI) občutljivemu sevu (Se^S) kvasovke *S. pombe*, ki so prikazani na Slikah 10 do 17. Do povečanih aktivnosti encimov pri na selen(VI) občutljivemu sevu pri vseh koncentracijah dodanega selena(VI) v gojišče je prišlo pri encimih katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPX) in glutation-reduktaza (GR). Aktivnosti encima Cu,ZnSOD in celokupna aktivnost SOD je nespremenjena, pri encimu MnSOD pa je prišlo do povečanja aktivnosti pri 0,4 in 4 mM koncentraciji selena(VI) dodanega v gojišče. Aktivnost glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze se je povečala le pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI).

Preglednica 3: Vpliv selena(VI) na učinkovitost encimov antioksidativnega obrambnega sistema in vsebnost glutaciona v reducirani obliki pri kvasovki *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S); rezultati so podani kot povprečna vrednost meritev dveh neodvisnih gojitev \pm SD

Spec. akt. (U/mg)	Kontrola		0,04 mM		0,4 mM		4 mM	
	ZIM 1889 (Se^R)	ZIM 1878 (Se^S)	ZIM 1889 (Se^R)	ZIM 1878 (Se^S)	ZIM 1889 (Se^R)	ZIM 1878 (Se^S)	ZIM 1889 (Se^R)	ZIM 1878 (Se^S)
Cel. SOD	13,2 \pm 0,4	13,0 \pm 1,1	13,0 \pm 0,8	13,9 \pm 3,6	13,8 \pm 1,1	13,3 \pm 1,7	13,3 \pm 0,6	13,6 \pm 1,2
MnSOD	0,9 \pm 0,4	1,0 \pm 0,6	0,7 \pm 0,4	1,3 \pm 0,7	1,0 \pm 0,5	3,1 \pm 0,6^b	1,0 \pm 0,6	3,3 \pm 0,6^b
Zn,CuSOD	12,4 \pm 0,3	12,0 \pm 1,4	12,3 \pm 0,3	12,5 \pm 4,1	12,8 \pm 1,1	10,2 \pm 1,6	12,3 \pm 0,3	10,3 \pm 1,4
CAT	8,7 \pm 1,9	22,4 \pm 4,7	10,4 \pm 4,4	66,9 \pm 3,0^b	9,2 \pm 1,5	106,3 \pm 8,3^b	8,3 \pm 2,5	113,0 \pm 4,3^b
*GPX	28 \pm 1	28 \pm 4	28 \pm 1	38 \pm 5^a	28 \pm 2	51 \pm 3^b	28 \pm 2	52 \pm 6^b
*GR	17 \pm 11	10 \pm 1	18 \pm 10	101 \pm 4^b	19 \pm 10	44 \pm 3^b	15 \pm 5	37 \pm 2^b
G6PDH	0,41 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,57 \pm 0,05^b	0,36 \pm 0,02	0,30 \pm 0,08	0,36 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01
Glutacion (μ mol/g)	2,56 \pm 0,09	4,30 \pm 0,16	2,64 \pm 0,40	0,73 \pm 0,03^b	2,95 \pm 0,46	0,40 \pm 0,16^b	2,89 \pm 0,40	0,29 \pm 0,04^b

Opombe: * - specifična aktivnost v mU/mg; ^a - $p < 0,01$, ^b - $p < 0,001$ ($n \geq 6$)

Iz primerjave na selen(VI) odpornega in občutljivega seva je razvidna vloga encima ATP-sulfurilaza med redukcijskimi procesi selena(VI) in povezava s tvorbo ROS. Do redukcije selena(VI) zaradi neaktivnega encima ATP-sulfurilaza pri na selen(VI) odpornemu sevu ni prišlo, zato pri na selen(VI) odpornemu sevu ni povečanja aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema, kar je bilo pričakovano, saj ni prišlo niti do povečane znotrajcelične oksidacije (Slika 9), ki bi nakazala povečan oksidativni stres. Da selen(VI) ni toksičen za celice kvasovk, dokler ne pride do njegove redukcije, je že bilo dokazano. Če pa je bil v gojišče dodan selen(IV) namesto selena(VI), je prišlo do enakih inhibitornih učinkov na rast tako pri sevu Se^R kot pri sevu Se^S , dobljena rastna krivulja pa

je bila podobna kot pri sevu Se^{S} , ko je bil dodan selen(VI) (Raspor in sod., 2003). Redukcija selena(VI) pri sevu ZIM 1889 (Se^{R}) zaradi neaktivnega encima ATP-sulfurilaza ni možna, zato do nastanka ROS ni prišlo (Slika 9), le-ti pa bi lahko povzročili oksidativni stres in posledično povečano aktivnost encimov antioksidativnega obrambnega sistema.

Vloga mitohondrijske MnSOD pri kvasovki *S. pombe* pri odstranjevanju superoksidnega aniona ($\text{O}_2^{\cdot-}$) je zelo pomembna, saj mutacije v genu, ki nosi zapis za MnSOD, pri oksidativnem stresu povzroči smrt celice (Jeong in sod., 2001), prav tako pa je pomembna tudi citoplazemska Cu,ZnSOD (Mutoh in sod., 2002). Pri na selen(VI) občutljivem sevu je prišlo do povečanja aktivnosti MnSOD pri 0,4 in 4 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču, kar nakazuje na povečano tvorbo superoksidnega aniona (Preglednica 3). Do povečanja aktivnosti Cu,ZnSOD pri na selen(VI) občutljivemu sevu ni prišlo, kar je morda posledica regulacije encima na več nivojih (transkripcijski, post-transkripcijski, translacijski in post-translacijski nivo), saj je bilo pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida intermedia* ugotovljeno, da oksidativni stres ne povzroči nujno povečanje aktivnosti encima Cu,ZnSOD (Cyrne in sod., 2003; Fujs in sod., 2005).

Dodatek selena(VI) v gojišče je povzročil 3- do 5-krat povečano aktivnost encima katalaza (CAT) pri na selen(VI) občutljivem sevu kvasovke *S. pombe* (Preglednica 3). Povečana aktivnost encima CAT je lahko posledica povečanega delovanja SOD, kjer nastane H_2O_2 . Znano pa je tudi, da lahko med redukcijskimi procesi selena(VI) nastane vodikov selenid (H_2Se) (Slika 3), ob nadaljnji reakciji H_2Se z glutationom (GSH) pa naj bi prišlo do nastanka H_2O_2 (Bébién in sod., 2002), kar je lahko dodatni vzrok oksidativnega stresa in povečane aktivnosti CAT.

Odstranjevanje H_2O_2 katalizira tudi encim glutation-peroksidaza (GPX), povečane aktivnosti encima prav tako nakazujejo na tvorbo H_2O_2 med redukcijskimi procesi selena(VI) pri na selen(VI) občutljivemu sevu, kjer se z večanjem koncentracije selena(VI) dodanega v gojišče povečuje tudi aktivnost GPX (Slika 14, Preglednica 3). Povečana aktivnost GPX pri dodatku 50 mg/l selena(VI) v gojišče je bila dokazana tudi pri kvasovki *Candida intermedia* (Fujs in sod., 2005). Antioksidativno vlogo GPX pri kvasovki *S. pombe* so dokazali Yamada in sod. (1999), kjer je prišlo do odstranjevanja H_2O_2 tudi brez aktivnosti encima CAT, vendar je morala biti GPX prekomerno izražena. Odstranjevanje H_2O_2 je zelo pomembno, saj lahko ob prisotnosti železa in bakra pride do nastanka močno reaktivnega hidroksilnega radikala, ki poškoduje celične makromolekule. Znano je, da poškodbe DNA vodijo do mutacij, le-te pa lahko privedejo do rakavih obolenj (Matés in Sánches-Jiménes, 2000), zato je vloga pri odstranjevanju ROS tako GPX kot CAT za preživetje celice ključnega pomena.

Povečana aktivnost GR je povezana z odpornostjo kvasovk na selen. To so dokazali Pinson in sod. (2000), kjer je prekomerno izražanje gena za glutation-reduktazo (GR) povzročilo izboljšanje odpornosti kvasovke *S. cerevisiae* pri povečanih koncentracijah selena(IV). Medtem ko GPX povzroči katalizo pretvorbe H_2O_2 v H_2O in O_2 z oksidacijo GSSG, GR katalizira pretvorbo oksidirane oblike glutationa (GSSG) v reducirano obliko (GSH). Tako je zagotovljeno ravnotežje med reducirano in oksidirano obliko glutationa (Jamieson, 1998). Med oksidativnim stresom pride do porušanja ravnotežja. To je razvidno tudi iz Slik 14 in 15, saj pride do spremenjene aktivnosti GPX in GR pri dodatku selena(VI) v gojišče

pri sevu ZIM 1878 (Se^{S}). Največja aktivnost GR je pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču, saj je prišlo do 10-kratnega povečanja v primerjavi s kontrolo, najmanjše povečanje aktivnosti (3,7-kratno) pa je prišlo pri koncentraciji 4 mM selena(VI) v gojišču (Slika 15). Nižje aktivnosti GR pri višjih koncentracijah dodanega selena(VI) v gojišče lahko razložimo s povezavo z reducirajočo močjo NADPH, ki jo za delovanje potrebuje encim GR. Z večanjem koncentracije dodanega selena(VI) v gojišče, se je povečevala tudi bioakumulacija selena, kjer je bila bioakumulacija selena pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI) dodanega v gojišče $134 \pm 7 \mu\text{g Se/g}$ suhe biomase, pri 4 mM koncentraciji selena(VI) pa $307 \pm 37 \mu\text{g Se/g}$ suhe biomase (Raspor in sod., 2003). Pri tem se porabita tako ATP kot NADPH (Slika 1), NADPH pa je potreben tudi za delovanje encima GR. Aktivnost encima GR je odvisna tudi od delovanja encima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH), ki zagotavlja redukcijsko moč (Izawa in sod., 1998).

Kot že omenjeno, mora celica med oksidativnim stresom zagotoviti potrebne količine NADPH, ki je glavna reducirajoča moč za antioksidativne encime. Znano je, da je glavna pot razgrajevanja glukoze, ki predstavlja glavni vir ogljika in energije v celici, glikoliza. Vendar se lahko ob povečani potrebi celice po reducirajoči moči, kot je NADPH, pot razgradnje glukoze preusmeri v pot pentoza-fosfata. Prvi encim, ki regulira tok glukoze v tej poti, je G6PDH, zato je povečana aktivnost encima znak za razgradnjo glukoze po poti pentoza-fosfata ter povečano potrebo celice po NADPH. Med izpostavitvijo celic kvasovke *S. cerevisiae* stresu zaradi vodikovega peroksida je poleg povečane indukcije antioksidativnih obrambnih sistemov tako prišlo tudi do povečane indukcije encima G6PDH in zaustavitve glikolitične poti razgradnje glukoze (Godon in sod., 1998).

Ker je izpostavitvev selena(VI) povzročila oksidativni stres na selen(VI) občutljivega seva kvasovke *S. pombe* (Slika 9), pričakujemo povečano delovanje G6PDH. Do bistvenega povečanja aktivnosti G6PDH pri na selen(VI) občutljivemu sevu je prišlo pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču, pri 0,4 in 4 mM koncentraciji selena(VI) pa ne. Največja aktivnost G6PDH pri 0,04 mM koncentraciji selena(VI) nakazuje na povečano potrebo celice po NADPH v celici, kar je značilno za razmere med oksidativnim stresom. Povečana potreba po NADPH je predvsem zaradi povečane aktivnosti antioksidativnih encimov kot je GR, sa je za njeno delovanje potrebna redukcijska moč v obliki NADPH (Izawa in sod., 1998). To pa je razvidno tudi iz rezultatov, ki smo jih med eksperimentalnim delom pridobili (Sliki 15 in 16).

Povečane aktivnosti MnSOD, CAT in GPX pri višjih koncentracijah selena(VI) v gojišču (Preglednica 3) ne vodijo k večji preživelosti (Slika 8) celic kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}). Vzrok je lahko oksidativni stres, ki ga izzove redukcija selena(VI), v tako obsežni meri, da se kljub indukciji antioksidativnih obrambnih sistemov kvasovke na nastale razmere ne prilagodijo oz. se znotrajcelične poškodbe, ki so posledica oksidativnega stresa, ne popravijo v pravnji meri. Koncentracija nastalih ROS preseže kapaciteto encimov antioksidativnega obrambnega sistema, zato pride do poškodb celičnih makromolekul, kar vodi v programirano (apoptoza) ali navadno (nekroza) celično smrt. Kljub temu so encimi antioksidativnega obrambnega sistema pomembni pri pridobivanju odpornosti na selen(VI), saj bi se vsebnost ROS, ki lahko povzročijo poškodbe celice, povečala, kar bi najverjetneje povzročilo večjo umrljivost med celicami kvasovk. Dodaten razlog za manjšo preživelost celic je lahko inhibicija α -DNA-polimeraze in genotoksičnost selena(IV)

(Bronzetti in sod., 2001; Pinson in sod., 2000). Kot že omenjeno, ima pri večjih koncentracijah dodanega selena(VI) v gojišče dodaten vpliv na zmanjšano odpornost kvasovk na selen(VI) tudi zakisanje rastnega medija zaradi izčrpavanja vodikovih ionov s pomočjo H^+ -ATPaze ter znotrajcelično zakisanje zaradi pomanjkanja ATP, ki se porablja v transportnih in redukcijskih procesih selena(VI). Ta pojav je bil opažen tudi pri izpostavljenosti kvasovke *Kluyveromyces marxianus* na selen(VI) (Fujs, 2004).

Sposobnost celice, da lahko reducira selen(VI), je povezana tudi z vsebnostjo glutaciona v reducirani obliki (GSH) v celici. Iz Slike 17 je razvidno, da je vsebnost GSH pri na selen(VI) odpornemu sevu neodvisna od koncentracije selena(VI) dodanega v gojišče. Nespremenjeno znotrajcelično oksidacijo pri na selen(VI) odpornemu sevu (Slika 9) še dodatno potrdimo zaradi nespremenjenih aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema ter nespremenjene vsebnosti GSH. Iz tega lahko sklepamo, da pri sevu kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^R) med redukcijskimi procesi selena(VI) ni prišlo do nastanka tolikšne količine ROS, ki bi lahko povzročili oksidativni stres. Razlog je v neaktivnosti encima ATP-sulfurilaza, zaradi česar ne pride do redukcije selena(VI), saj ne pride do aktivacije selena(VI), ki je pomembna za nadaljnjo redukcijo in posledično ni tvorbe ROS (Pinson in sod., 2000; Raspor in sod., 2003).

Pri na selen(VI) občutljivemu sevu je prišlo do zmanjševanja vsebnosti GSH z večanjem koncentracij dodanega selena(VI) v gojišče (Slika 17, Preglednica 3), kljub povečani aktivnosti GR, ki oskrbuje celico z GSH (Slika 15). Pri 4 mM koncentraciji dodanega selena(VI) je vsebnost GSH kar 14-krat manjša v primerjavi s kontrolo, čeprav je aktivnost GR povečana. Vzrok za to lahko iščemo v dodatni vlogi GSH ob prisotnosti selena(VI). Poleg antioksidativne vloge GSH lahko GSH reagira tudi s selenom v neencimski redukciji, kjer naj bi prišlo do nastanka ROS (Dilworth in Bandurski, 1977; Shen in sod., 2000). Pinson in sod. (2000) so predlagali, da neencimska redukcija povzroči zmanjšanje vsebnosti GSH v citoplazmi, saj naj bi prišlo do transporta selena(IV) v kompleksu glutation-konjugiran selen(IV) v vakuole. V vakuolah pa ponovna regeneracija glutaciona do reducirane oblike GSH s pomočjo GR ni možna (Pinson in sod., 2000), zato je poleg zmanjševanja vsebnosti GSH zaradi antioksidativne vloge, lahko to še dodaten razlog za manjše vsebnosti GSH v celicah kvasovk izpostavljene selenu(VI).

Nastanek ROS, indukcija apoptoze, zmanjševanje GSH ter povečevanje vsebnosti oksidirane oblike glutaciona (GSSG) je povzročilo tudi dodajanje selena(IV) hepatomski humani celični liniji (HepG₂) (Shen in sod., 1999). Prav tako je bila dokazana dvojna vloga GSH, kjer lahko GSH zaradi neencimske redukcije selena povzroči nastanek ROS in s tem oksidativni stres (pro-oksidativna vloga), ali pa deluje antioksidativno (Shen in sod., 2000). Zato bi selen lahko bil uporabljen kot protirakavo zdravilo, saj imajo rakavo spremenjene celice večjo vsebnost GSH, prav tako pa tudi odporne rakavo spremenjene celice, ki manjšajo uspeh zdravljenja s kemoterapijo. Znano pa je, da pride pri celicah z večjo vsebnostjo GSH do večjega učinka citotoksičnosti selena, saj so celice izpostavljene večjemu nastanku ROS in močnejšemu oksidativnemu stresu, ki je posledica reagiranja GSH s selenom ter encimske redukcije selena (Shen in sod., 2000).

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da so antioksidativni obrambni sistemi kvasovk pomembni za delovanje in razmnoževanje celic pri pridobivanju odpornosti na selen(VI). Zaradi podobnosti selena(VI) s sulfatnim ionom je obema ionoma skupen tako transport v celice kot metabolizem, vendar kljub temu obstajajo številna odprta vprašanja glede metabolizma selena(VI). S primerjavo na selen(VI) odpornega in na selen(VI) občutljivega seva kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* smo pojasnili, da ob prisotnosti aktivnega encima sulfatne asimilacijske poti ATP-sulfurilaze prihaja do nastanka ROS med redukcijskimi procesi selena(VI). ROS inducirajo oksidativni stres, ob tem pa pride do povečane aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema ter do zmanjšanja znotrajcelične vsebnosti GSH.

5.2 SKLEPI

Dodatek treh koncentracij (0,04, 0,4 in 4 mM) selena(VI) v gojišče ne vpliva na spremembo rasti kvasovke *Schizosaccharomyces pombe* sev ZIM 1889 (Se^R), medtem ko se z večanjem koncentracij dodanega selena(VI) v gojišče zmanjšuje rast pri na selen(VI) občutljivemu sevu. Tako je pri 0,4 in 4 mM koncentraciji dodanega selena(VI) rast močno inhibirana, prav tako se zmanjša tudi število kolonijskih enot in relativna živost, ki doseže vrednost 2 %. Na kondicijo celic na selen(VI) odpornega seva dodatek selena(VI) v gojišče ne vpliva, prav tako pa ni prišlo do povečane znotrajcelične oksidacije, medtem ko se je pri na selen(VI) občutljivem sevu znotrajcelična oksidacija v primerjavi s kontrolo povečala.

Raziskali smo tudi vpliv selena(VI) na aktivnost encimov (CAT, GPX, GR, MnSOD, Cu,ZnSOD, G6PDH) antioksidativnega obrambnega sistema kvasovke *S. pombe*. Ugotovili smo, da pri sevu ZIM 1889 (Se^R) ne pride do povečanih aktivnosti encimov pri dodajanju selena(VI) v gojišče. Pri na selen(VI) občutljivem sevu pa se poveča aktivnost encimov CAT in GPX v odvisnosti od dodanega selena(VI) v gojišče, na celokupno aktivnost in aktivnost Cu,ZnSOD pa dodatek selena(VI) ne vpliva. Do sprememb v encimskih aktivnosti pri posameznih koncentracijah dodanega selena(VI) je prišlo pri encimih MnSOD in G6PDH.

Razlika med sevoma obstaja tudi pri vsebnosti reduciranega glutationa (GSH) v celicah. Le-ta se ne spremeni pri sevu ZIM 1889 (Se^R), pri sevu ZIM 1878 (Se^S) pa se vsebnost GSH z naraščanjem dodanega selena(VI) zmanjšuje.

Zaključimo lahko, da je toksičnost selena(VI) povezana z njegovo redukcijo zaradi aktivnega encima ATP-sulfurilaza, pri tem pa nastajajo reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Posledica le-tega je oksidativni stres, med katerim pride do spremenjene aktivnosti antioksidativnih obrambnih sistemov.

6 POVZETEK

Selen je eden pomembnejših elementov tako za sesalce kot za mikroorganizme. Kot selenocistein je sestavni del selenoproteinov, med njimi tudi encima antioksidativnega obrambnega sistema glutation-peroksidaze (GPX). V večjih koncentracijah pa postane toksičen. Vstop v celice zagotavlja nepoškodovana asimilacijska transportna pot sulfata, v kateri ima najpomembnejšo vlogo encim ATP-sulfurilaza, ki je odgovoren za aktivacijo selena(VI) v adozin-fosfoselenat (APSe). Le-ta se nadalje reducira, kar naj bi povzročilo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). ROS pa naj bi nastajali tudi med neencimsko redukcijo selena(VI) med reakcijo selenita z reducirano obliko glutationa (GSH). Povečan nastanek ROS vodi v povečano delovanje antioksidativnih obrambnih sistemov. Da bi preučili njihovo vlogo pri odpornosti na selen(VI), smo uporabili dva seva kvasovke vrste *Schizosaccharomyces pombe*, ZIM 1889, na selen(VI) odporni sev (Se^R), in ZIM 1878, na selen(VI) občutljivi sev (Se^S). Tri različne koncentracije (0,04, 0,4 in 4 mM) dodanega selena(VI) v gojišče so povzročile zmanjšanje rasti pri sevu Se^S , pri na selen(VI) odpornemu sevu pa ni prišlo do razlik v rasti. Posledično tudi ni razlik v številu kolonijskih enot, skupnem številu celic in relativni živosti pri sevu Se^R , medtem ko sta 0,4 in 4 mM koncentraciji pri na selen(VI) občutljivemu sevu povzročili občutno zmanjšanje števila kolonijskih enot in skupnega števila celic. Relativna živost pa je dosegla vrednost 2 %. 0,04 mM koncentracija selena(VI) je bila manj toksična za na selen(VI) občutljivi sev kot 0,4 in 4 mM koncentracija dodanega selena(VI) v gojišče, saj je bila relativna živost 22 %. Povečan oksidativni stres pri sevu Se^S je bil dokazan z uporabo barvila H_2DCF , medtem ko pri sevu Se^R ni prišlo do povečanja znotrajcelične oksidacije. Zaradi oksidativnega stresa je prišlo do povečanih aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema pri na selen(VI) občutljivemu sevu, in sicer: Mn vsebujoča superoksid-dismutaza (MnSOD), glutation-peroksidaza (GPX), katalaza (CAT), glutation-reduktaza (GR) in glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PDH), medtem ko se Cu,ZnSOD aktivnost ni povečala. Aktivnost MnSOD, CAT in GPX so se povečevale v odvisnosti od povečanih koncentracij dodanega selena(VI) v gojišče. Tako se je aktivnost pri 4 mM koncentraciji selena(VI) v gojišču pri MnSOD povečala za 3,3-krat, pri CAT za 5-krat ter pri GPX za 1,9-krat v primerjavi s kontrolo. Pri encimu GR pa je bila največja aktivnost dosežena pri 0,04 mM koncentraciji dodanega selena(VI), kjer je bilo povečanje kar 10-kratno v primerjavi s kontrolo, pri 0,4 in 4 mM pa je bila povečana aktivnost za približno 4-krat. Aktivnost encima G6PDH je bila povečana le pri 0,04 mM koncentraciji, in sicer za 1,8-krat v primerjavi s kontrolo. Do povečanih aktivnosti encimov antioksidativnega obrambnega sistema pri na selen(VI) odpornemu sevu ni prišlo. To nakazuje na tvorbo ROS in oksidativni stres pri izpostavljenosti na selen(VI) le, če je aktiven encim ATP-sulfurilaza, ki omogoči redukcijo selena(VI), med katero pride do nastanka ROS. Če pride do redukcije selena(VI) do selenita, lahko le-ta reagira tudi z GSH, kar predstavlja dodaten razstrupljevalni mehanizem. Vendar to povzroči pomanjkanje GSH v citoplazmi, hkrati pa se ob tem tvorijo tudi ROS, ki še dodatno prispevajo k oksidativnemu stresu. Nižje znotrajcelične vsebnosti GSH pri vseh treh dodanih koncentracijah selena(VI) v gojišče pri na selen(VI) občutljivemu sevu v primerjavi s kontrolo nakazujejo na odstranjevanje selena(VI) s pomočjo GSH, saj smo pri na selen(VI) odpornemu sevu dobili nespremenjene vsebnosti GSH v primerjavi s kontrolo.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 195 str.
- Akerboom T.P.M., Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed with disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, 77: 373-382
- Bébian M., Lagniel G., Garin J., Touati D., Verméglio A., Labarre J. 2002. Involvement of superoxide dismutases in the response of *Escherichia coli* to selenium oxides. *Journal of Bacteriology*, 184, 6: 1556-1564
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 7: 248-254
- Bronzetti G., Cini M., Andreoli E., Caltavuturo L., Panunzio M., Della Croce C. 2001. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mutation Research*, 496: 105-115
- Camougrand N., Rigoulet M. 2001. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Respiration Physiology*, 128: 393-401.
- Chignell C., Sik R.H. 2003. A photochemical study of cells loaded with 2',7'-dichlorofluorescein: implications for the detection of reactive oxygen species generated during UVA irradiation. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 8: 1029-1034
- Combs G.F. 1993. Selenium: Properties and determination. V: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Volume 6. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 4014-4018
- Combs G.F.Jr., Gray W.P. 1998. Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmacology and Therapeutics*, 79, 3:179-192
- 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
- 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
- Dilworth G.L., Bandurski R.S. 1977. Activation of selenate by adenosine 5'-triphosphate sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 163: 521-529

- El-Bayoumy K. 2001. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutation Research*, 475: 123-139
- Falcone G., Nickerson W.J. 1962. Reduction of selenite by intact yeast cells and cell-free preparations. *Journal of Bacteriology*, 85: 754-762
- Foster L.H., Sumar S. 1997. Selenium in health and disease: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 3: 211-228
- Fujs Š. 2004. Metabolni odziv kvasovke *Kluyveromyces marxianus* na selen. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Intredisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 131 str.
- Fujs Š., Gazdag Z., Poljšak B., Stibilj V., Milačič R., Pesti M., Raspor P., Batič M. 2005. The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 2: 125-135
- Gharieb M.M., Wilkinson S.C., Gadd G.M. 1995. Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 300-311
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buchler J.-M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B., Labarre J. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34: 22480–22489
- 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
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Holyoak, C.D., Stratford M., McMullin Z., Cole M.B., Crimmins K., Brown, A.J.P., Coote P.J. 1996. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 9: 3158-3164
- Ibrahim W., Lee U.-S., Yen H.-C., Clair D.K.S., Chow C.K. 2000. Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 3: 397-402
- Izawa S., Inoue Y., Kimura A. 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320: 61-67

- Izawa S., Maeda K., Miki T., Mano J., Inoue Y., Mikura A. 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 330: 811-817
- Jakubowski W., Bartosz G. 2000. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biology International*, 24, 10: 757-760
- 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
- Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527
- Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 6: 316-323
- Jeong J.-H., Kwon E.-S., Roe J.-H. 2001. Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283: 908–914
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 249 str.
- Lawrence R.A., Burk R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71, 4: 952-958.
- Lee J., Kwon, Kim D.-W., Cha J., Roe J.-H. 2002. Regulation and the role of Cu,Zn-containing superoxide dismutase in cell cycle progression of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297: 854–862
- Levander O.A. 1986. Selenium. V: Trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. Volume 2. Mertz W. (ed.). Orlando, Florida, Academic Press: 209-279
- Lipinski B. 2005. Rationale for the treatment of cancer with sodium selenite. *Medical Hypotheses*, 64: 806–810
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32: 157-170
- Mendoza-Cózatl D., Loza-Tavera H., Hernández-Navarro A., Moreno-Sánchez R. 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 653-671

- Moradas-Ferreira P., Costa V. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5, 5: 277-285
- Mutoh N., Chiaki. C., Nakagawa W., Yamada K. 2002. Characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase-deficient mutant of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics*, 41: 82–88
- Myhre O., Andersen J.M., Aarnes H., Fonnum F. 2003 Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*, 65, 10: 1575-1582
- 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
- Penninckx M. 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 737-742
- Penninckx M.J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2: 295-305
- Pilon-Smits E. A.H. Hwang S., Lytle C.M., Zhu Y., Tai J.C., Bravo R.C., Chen Y., Leustek T., Terry N. 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology*, 119: 123-132
- Pine L., Hoffman P.S., Malcom G.B., Benson R.F., Keen M.G. 1984. Determination of catalase, peroxidase and superoxide dismutase within the genus *Legionella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 3: 421-429
- Pinheiro R., Belo I., Mota M. 2000. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 9-10: 756-762
- Pinson B., Sagot I., Daignan-Fornier B. 2000. Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 36, 3: 679-687
- Pinto M.C., Mata M., Lopez-Barea S. 1984. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 228: 1-12
- Pitt J.I., Hocking A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. London, Blackie Academic and Professional: 593 str.

- Postma E., Verduyn C., Scheffers W.A., van Dijken J.P. 1989. Enzymic analysis of Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2: 468-477.
- Raspor P., Batič M., Jamnik P. 1999. Measurement of yeast viability/mortality in the presence of chromium(IV). *Food Technology and Biotechnology*, 37, 2: 81-86.
- Raspor P., Fujs Š., Banzky L., Maraz A., Batič M. 2003. The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Biotechnology and Microbiology*, 63: 89-95
- Raspor P., Smole-Možina S. 1993. *Praktikum iz biotehnologije*. Ljubljana, BIA d.d.: 148 str.
- Ravindranath S.D., Fridovich I. 1973. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 15: 6107-6112
- Rayman M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356: 233-241
- Sedlak J., Lindsay R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192-205
- Shen H.-M., Yang C.-F., Ong C.-N. 1999. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *International Journal of Cancer*, 81, 5: 820-828
- Shen H.-M., Yang C.-F., Liu J., Ong C.-N. 2000. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 7: 1115-1124
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms – I, Microbial vs. higher cells – damage and defences in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44, 6: 587-624
- Stohs S.J., Bagchi D. 1994. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 2: 321-326
- Sugiyama K., Kawamura A., Izawa S., Inoue Y. 2000. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 352: 71-78
- Temple M.D., Perrone G.G., Dawes I.W. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, 15, 6: 319-326
- Thomas D., Surdin-Kerjan Y. 1997. Metabolism of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 4: 503-532

Tinggi U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*, 137: 103-110

Turner R.J., Weiner J.H., Taylor D.E. 1998. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *BioMetals*, 11: 223-227

Wickens A.P. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, 128: 379-391

Yamada K., Nakagawa C.W., Mutoh N. 1999. *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant. *Yeast*, 15: 1125-1132

Yanagida M. 2002. The unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biology*, 3, 3: 2003.1-2003.4

ZAHVALA

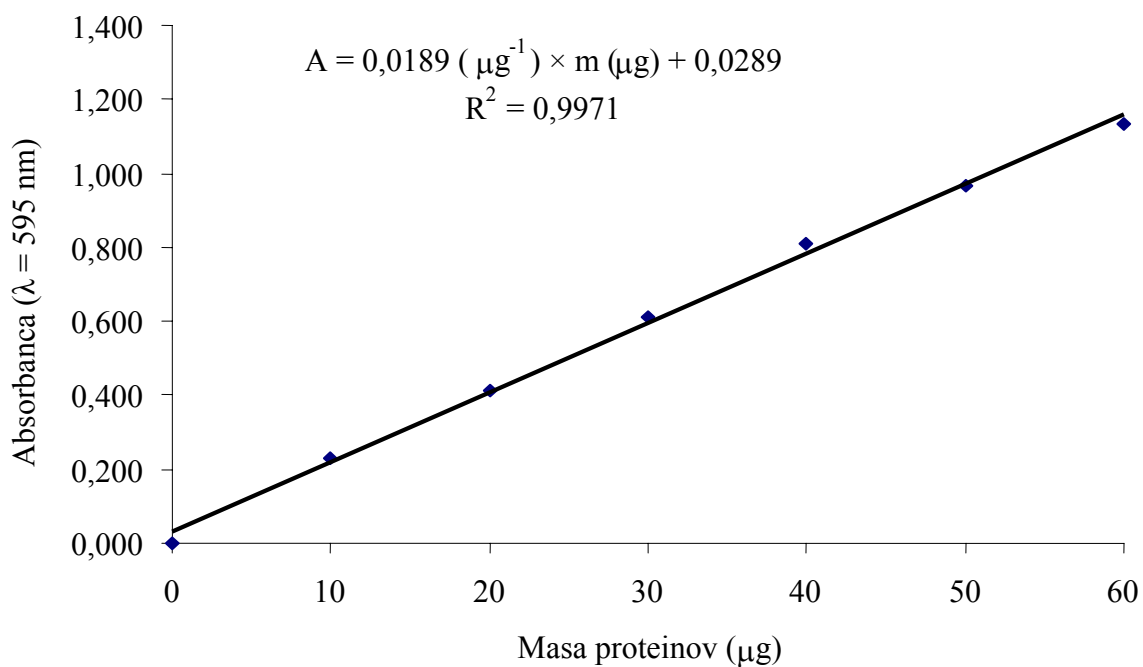
Največja zahvala gre delovnemu mentorju dr. Štefanu Fujsu za vodenje pri eksperimentalnemu delu ter za vse nasvete, posvete in pripombe pri pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem mentorju prof. dr. Petru Rasporju in recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću za pregled in vzpodbudne nasvete pri nastanku pisnega dela.

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

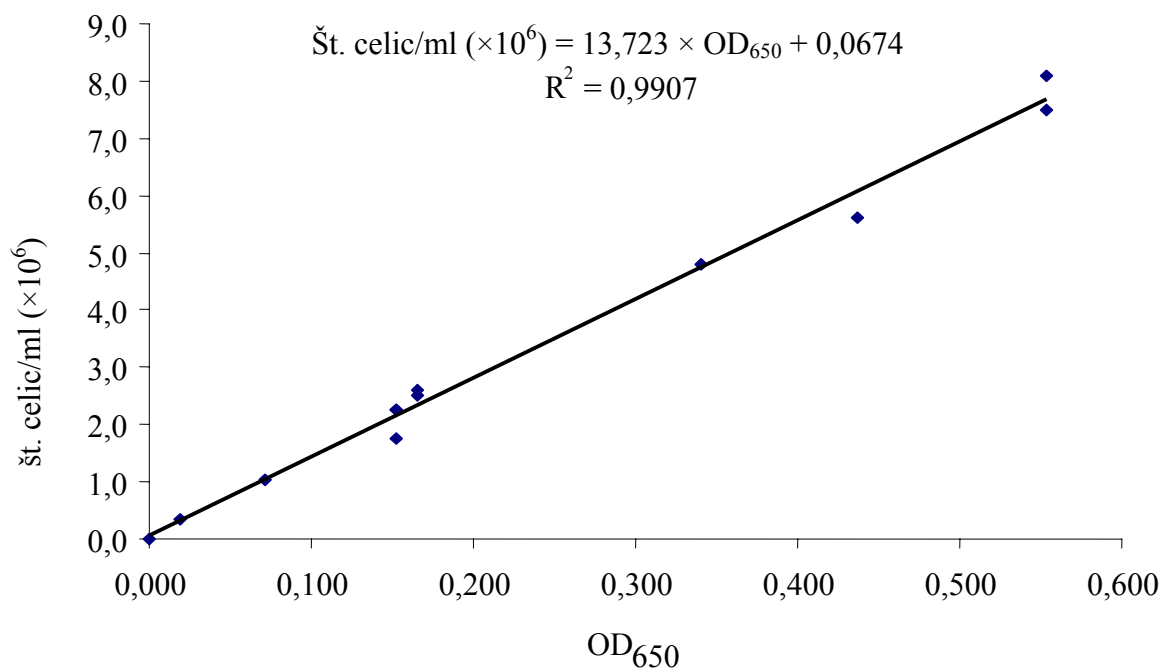
Zahvala gre tudi ga. Ivici Hočevar za pregled diplomske naloge.

Hvala podpori družine in vsem najbližjim.

PRILOGE



Priloga A1: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu; masa proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA



Priloga B1: Umeritvena krivulja za določevanje števila celic/ml (št. celic/ml v odvisnosti od OD₆₅₀)

Priloga C1: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^{R}) brez dodanega selena(VI) (kontrola)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,044	0,066	0,064	0,082	0,064	0,016	24,3
10	0,505	0,438	0,461	0,53	0,484	0,042	8,6
12	0,770	0,696	0,706	0,804	0,744	0,052	7,0
14	1,105	0,982	1,017	1,127	1,058	0,069	6,6
16	1,424	1,353	1,332	1,435	1,386	0,051	3,7
18	1,630	1,544	1,525	1,624	1,581	0,054	3,4
20	1,688	1,601	1,631	1,706	1,657	0,049	3,0
34	1,727	1,652	1,734	1,804	1,729	0,062	3,6

Priloga C2: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^{R}) z 0,04 mM koncentracijo selena(VI)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,058	0,042	0,069	0,094	0,066	0,022	33,2
10	0,491	0,522	0,611	0,636	0,565	0,069	12,3
12	0,775	0,812	0,890	0,960	0,859	0,083	9,6
14	1,082	1,142	1,200	1,319	1,186	0,101	8,5
16	1,419	1,470	1,504	1,597	1,498	0,075	5,0
18	1,605	1,634	1,643	1,747	1,657	0,062	3,7
20	1,688	1,700	1,711	1,754	1,713	0,029	1,7
34	1,740	1,752	1,802	1,848	1,786	0,050	2,8

Priloga C3: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^{R}) z 0,4 mM koncentracijo selena(VI)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,065	0,080	0,047	0,066	0,065	0,014	21,0
10	0,547	0,535	0,508	0,534	0,531	0,016	3,1
12	0,821	0,814	0,799	0,792	0,807	0,013	1,7
14	1,126	1,120	1,135	1,150	1,133	0,013	1,2
16	1,481	1,462	1,412	1,427	1,446	0,032	2,2
18	1,676	1,665	1,586	1,616	1,636	0,042	2,6
20	1,753	1,753	1,651	1,699	1,714	0,049	2,9
34	1,797	1,804	1,746	1,797	1,786	0,027	1,5

Priloga C4: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^{R}) s 4 mM koncentracijo selena(VI)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,026	0,035	0,034	0,040	0,034	0,006	17,2
10	0,453	0,446	0,584	0,548	0,508	0,069	13,6
12	0,711	0,725	0,894	0,819	0,787	0,086	10,9
14	1,015	1,045	1,227	1,143	1,108	0,097	8,7
16	1,396	1,378	1,461	1,411	1,412	0,036	2,5
18	1,586	1,597	1,604	1,555	1,586	0,022	1,4
20	1,682	1,676	1,666	1,653	1,669	0,013	0,8
34	1,726	1,706	1,755	1,744	1,733	0,021	1,2

Priloga C5: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) brez dodanega selena(VI) (kontrola)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,062	0,037	0,057	0,045	0,050	0,011	22,6
10	0,490	0,391	0,412	0,405	0,425	0,045	10,5
12	0,704	0,611	0,678	0,659	0,663	0,039	5,9
14	0,963	0,874	0,961	0,936	0,934	0,042	4,4
16	1,282	1,174	1,262	1,253	1,243	0,047	3,8
18	1,491	1,392	1,473	1,454	1,453	0,043	3,0
20	1,618	1,560	1,534	1,537	1,562	0,039	2,5
34	1,854	1,794	1,792	1,814	1,814	0,029	1,6

Priloga C6: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) z 0,04 mM koncentracijo selena(VI)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,087	0,042	0,045	0,035	0,052	0,024	45,1
10	0,361	0,289	0,289	0,292	0,308	0,036	11,5
12	0,469	0,403	0,407	0,418	0,424	0,031	7,2
14	0,574	0,502	0,495	0,539	0,528	0,037	6,9
16	0,613	0,623	0,604	0,648	0,622	0,019	3,1
18	0,830	0,743	0,671	0,708	0,738	0,068	9,2
20	0,963	0,886	0,795	0,870	0,879	0,069	7,8
34	1,682	1,581	1,601	1,600	1,616	0,045	2,8

Priloga C7: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) z 0,4 mM koncentracijo selen(VI)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,056	0,078	0,060	0,033	0,057	0,019	32,6
10	0,110	0,146	0,145	0,110	0,128	0,021	16,0
12	0,140	0,182	0,176	0,147	0,161	0,021	12,9
14	0,129	0,168	0,208	0,153	0,165	0,033	20,2
16	0,174	0,196	0,207	0,163	0,185	0,020	10,9
18	0,157	0,188	0,205	0,169	0,180	0,021	11,8
20	0,158	0,181	0,175	0,134	0,162	0,021	13,0
34	0,173	0,200	0,231	0,192	0,199	0,024	12,1

Priloga C8: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) med aerobno kultivacijo z enkratnim polnjenjem (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) s 4 mM koncentracijo selen(VI)

Čas (h)	1. meritev	2. meritev	3. meritev	4. meritev	Povprečje ($\lambda = 650$ nm)	SD	KV (%)
0	0,084	0,030	0,081	0,072	0,067	0,025	37,5
10	0,141	0,091	0,131	0,129	0,123	0,022	17,9
12	0,158	0,101	0,183	0,161	0,151	0,035	23,2
14	0,177	0,110	0,194	0,173	0,164	0,037	22,5
16	0,183	0,124	0,184	0,168	0,165	0,028	17,1
18	0,190	0,131	0,186	0,172	0,170	0,027	15,9
20	0,178	0,134	0,171	0,175	0,165	0,021	12,5
34	0,185	0,126	0,208	0,204	0,181	0,038	20,9

Priloga D1: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^{R}) za določevanje skupnega števila celic v sredini eksponentne faze

	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	0,289	0,295	0,287	0,301	0,269	0,289	0,269	0,278	0,285	0,012	4,2
0,04 mM	0,260	0,253	0,241	0,240	0,327	0,222	0,231	0,224	0,250	0,034	13,6
0,4 mM	0,248	0,282	0,286	0,242	0,318	0,279	0,285	0,312	0,282	0,027	9,6
4 mM	0,285	0,249	0,293	0,297	0,322	0,36	0,329	0,333	0,309	0,034	11,0

Priloga D2: Merjenje optične gostote ($\lambda = 650$ nm) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1878 (Se^{S}) za določevanje skupnega števila celic v sredini eksponentne faze

	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	0,301	0,316	0,318	0,305	0,290	0,289	0,294	0,289	0,295	0,019	6,4
0,04 mM	0,100	0,109	0,100	0,119	0,105	0,093	0,109	0,097	0,104	0,008	7,6
0,4 mM	0,025	0,039	0,029	0,036	0,023	0,023	0,026	0,023	0,028	0,006	21,4
4 mM	0,03	0,034	0,026	0,031	0,022	0,021	0,021	0,022	0,026	0,005	19,2

Priloga D3: Število kolonij kvasovke *S. pombe* ZIM 1889 (Se^{R}) v sredini eksponentne faze inkubirane na YEED-agarju ($T = 28$ °C, $t = 3$ dni)

10^{-4} - kratna redčitev	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	106	112	122	138	107	116	107	115	115	11	9,2
0,04 mM	144	170	103	97	102	70	180	170	130	42	32,1
0,4 mM	108	115	144	136	102	104	127	126	120	15	12,8
4 mM	189	169	138	126	84	84	121	99	126	38	30,3
10^{-5} - kratna redčitev	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	20	20	15	19	14	13	16	16	17	3	16,4
0,04 mM	14	12	24	14	9	10	9	16	14	5	36,7
0,4 mM	14	16	18	16	10	14	16	15	15	2	15,8
4 mM	14	20	21	14	15	17	17	12	16	3	19,1

Priloga D4: Število kolonij kvasovke *S. pombe* ZIM 1878 (Se^{S}) v sredini eksponentne faze inkubirane na YEED-agarju ($T = 28$ °C, $t = 3$ dni).

10^{-4} - kratna redčitev	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	110	142	145	159	144	123	121	140	136	16	11,8
0,04 mM	32	31	33	38	26	36	32	36	33	4	11,3
0,4 mM	2	2	2	3	2	4	2	3	3	1	30,2
4 mM	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	35,6
10^{-5} - kratna redčitev	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	15	15	15	16	16	17	12	12	15	1,8	12,4
0,04 mM	6	4	3	2	4	2	1	1	3	1,7	60,1
0,4 mM*	41	40	40	31	30	34	39	34	36	4,4	12,2
4 mM*	39	25	34	27	29	19	25	19	27	6,9	25,4

Opomba: * - 10^{-3} -kratna redčitev

Priloga E1: Povprečje števila celic ter merjenje intenzitete fluorescence (RFE) za določevanje ocene znotrajcelične oksidacije stresane kulture (200 vrt./min, T = 28 °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze; rezultati so podani tudi v %, kjer velja, da ima kontrolni vzorec vrednost 100 %

ZIM 1889 (Se ^R)	Meritve								
Kontrola	1	2	3	4	5	6	Povprečje	SD	KV (%)
RFE	2311	2398	2242	2695	2796	2848	2548	263	10,3
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	6,2	4,8	3,3	3,3	3,3	3,3	4,0	1,2	29,6
0,04 mM									
RFE	2406	2661	2417	2355	2405	2448	2449	108	4,4
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	6,2	6,2	5,7	3,8	3,8	3,8	5,0	1,2	23,5
Vrednost v %	104	109	89	76	75	75	88	16	18
0,4 mM									
RFE	2364	2485	2661	3464	3522	3446	2990	542	18,1
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	6,2	6,2	6,1	5,7	5,7	5,7	5,9	0,3	4,3
Vrednost v %	101	101	93	75	73	70	86	14	17
4 mM									
RFE	2373	2564	2357	2423	2545	2579	2474	101	4,1
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	5,8	5,8	5,6	4,7	4,7	4,7	5,2	0,6	10,6
Vrednost v %	109	112	89	63	64	63	83	23	28
ZIM 1878 (Se ^S)	Meritve								
Kontrola	1	2	3	4	5	6	Povprečje	SD	KV (%)
RFE	2311	2721	2822	4824	5228	5124	3838	1354	35,3
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	5,2	5,2	5,2	8,1	8,1	8,1	6,7	1,6	23,9
0,04 mM									
RFE	2434	3175	3106	7284	7723	7545	5211	2543	48,8
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	3,7	5,1	5,1	8,9	8,9	8,9	6,8	2,4	35,4
Vrednost v %	153	130	119	177	166	167	152	23	15
0,4 mM									
RFE	4451	3490	3518	6023	6118	6276	4979	1319	26,5
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	5,0	4,7	4,7	5,5	5,5	5,5	5,2	0,4	7,7
Vrednost v %	275	159	152	215	191	206	200	44	22
4 mM									
RFE	3918	2927	2978	4661	4863	4976	4054	929	22,9
Povprečje števila celic (×10 ⁷ celic/ml)	5,7	4,3	4,3	5,0	5,0	5,0	5	1	10,8
Vrednost v %	206	136	132	151	141	153	153	27	18

Priloga F1: Merjenje absorbance ($\lambda = 595$ nm, 10-kratne redčitve, $V = 50$ μ L) in določitev vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih ($V = 50$ μ L) stresane kulture (YEPD gojišče, $T = 28$ °C, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) v sredini eksponentne faze rasti

1. gojitev	Meritev 1	Meritev 2	Povprečje	SD	KV (%)	Vsebnost proteinov (μ g)
Kontrola	0,638	0,596	0,617	0,030	4,8	311,2
0,04 Mm	0,538	0,564	0,551	0,018	3,3	276,2
0,4 Mm	0,556	0,562	0,559	0,004	0,8	280,5
4 Mm	0,703	0,739	0,721	0,025	3,5	366,2
2. gojitev	Meritev 1	Meritev 2	Povprečje	SD	KV (%)	Vsebnost proteinov (μ g)
Kontrola	0,551	0,517	0,534	0,024	4,5	267,2
0,04 mM	0,539	0,500	0,520	0,028	5,3	259,6
0,4 Mm	0,516	0,496	0,506	0,014	2,8	252,4
4 Mm	0,639	0,615	0,627	0,017	2,7	316,5

Priloga F2: Merjenje absorbance ($\lambda = 595$ nm, 10-kratne redčitve, $V = 50$ μ L) in določitev vsebnosti proteinov v celičnih ekstraktih ($V = 50$ μ L) stresane kulture (YEPD gojišče, $T = 28$ °C, 200 vrt./min) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponentne faze rasti

1. gojitev	Meritev 1	Meritev 2	Povprečje	SD	KV (%)	Vsebnost proteinov (μ g)
Kontrola	0,542	0,586	0,564	0,031	5,5	283,1
0,04 Mm	0,385	0,386	0,386	0,001	0,2	188,7
0,4 Mm	0,381	0,399	0,390	0,013	3,3	191,1
4 Mm	0,421	0,459	0,440	0,027	6,1	217,5
2. gojitev	Meritev 1	Meritev 2	Povprečje	SD	KV (%)	Vsebnost proteinov (μ g)
Kontrola	0,557	0,577	0,567	0,014	2,5	284,7
0,04 Mm	0,564	0,575	0,570	0,008	1,4	286,0
0,4 Mm	0,636	0,635	0,636	0,001	0,1	321,0
4 mM	0,519	0,529	0,524	0,007	1,3	262,0

Priloga F3: Sprememba absorbance ($\lambda = 550$ nm) v treh minutah ($\Delta A_{550}/3$ min) merjena pri celokupni aktivnosti encima superoksid-dismutaza (SOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28$ °C) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponentne faze rasti

ZIM 1889 (Se^R)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{550}/3$ min	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Slepi vzorec	0,140	0,150	0,153	0,131	0,175	0,154	0,114	0,046	40,7
Kontrola	0,045	0,051	0,057	0,043	0,059	0,051	0,051	0,006	12,4
0,04 Mm	0,047	0,051	0,060	0,040	0,058	0,048	0,051	0,007	14,6
0,4 Mm	0,049	0,054	0,058	0,033	0,049	0,039	0,047	0,009	19,9
4 Mm	0,054	0,058	0,057	0,042	0,060	0,045	0,053	0,007	14,1
ZIM 1878 (Se^S)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{550}/3$ min	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Slepi vzorec	0,149	0,137	0,178	0,146	0,160	0,130	0,150	0,017	11,4
Kontrola	0,047	0,042	0,061	0,052	0,051	0,063	0,053	0,008	15,3
0,04 mM	0,039	0,039	0,050	0,050	0,054	0,058	0,048	0,008	16,2
0,4 mM	0,039	0,036	0,047	0,054	0,060	0,057	0,049	0,010	20,1
4 mM	0,036	0,036	0,035	0,064	0,069	0,072	0,052	0,018	34,8

Priloga F4: Sprememba absorbance ($\lambda = 550 \text{ nm}$) v treh minutah ($\Delta A_{550}/3 \text{ min}$) merjena pri encimu Mn-vsebujoča superoksid-dismutaza (MnSOD) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

ZIM 1889 (Se^R)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{550}/3 \text{ min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Slepi vzorec	0,285	0,291	0,298	0,283	0,283	0,284	0,287	0,006	2,1
Kontrola	0,272	0,279	0,288	0,267	0,274	0,269	0,275	0,008	2,8
0,04 mM	0,277	0,280	0,291	0,264	0,265	0,264	0,278	0,009	3,2
0,4 Mm	0,274	0,279	0,284	0,258	0,271	0,275	0,274	0,009	3,2
4 Mm	0,283	0,283	0,279	0,262	0,275	0,279	0,274	0,011	4,1
ZIM 1878 (Se^S)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{550}/3 \text{ min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Slepi vzorec	0,307	0,277	0,263	0,280	0,276	0,290	0,282	0,015	5,3
Kontrola	0,279	0,260	0,271	0,270	0,273	0,274	0,271	0,006	2,3
0,04 mM	0,243	0,227	0,232	0,236	0,233	0,243	0,264	0,015	5,5
0,4 Mm	0,254	0,224	0,228	0,238	0,245	0,243	0,239	0,011	4,7
4 mM	0,291	0,254	0,258	0,271	0,256	0,255	0,236	0,006	2,7

Priloga F5: Sprememba absorbance ($\lambda = 240 \text{ nm}$) na minuto ($\Delta A_{240}/\text{min}$) merjena pri encimu katalaza (CAT) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

ZIM 1889 (Se^R)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{240}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,013	0,012	0,012	0,008	0,015	0,016	0,013	0,003	22,1
0,04 mM	0,011	0,010	0,011	0,017	0,027	0,015	0,015	0,006	42,2
0,4 Mm	0,011	0,011	0,012	0,015	0,015	0,016	0,013	0,002	16,9
4 mM	0,007	0,012	0,012	0,009	0,017	0,015	0,012	0,004	30,7
ZIM 1878 (Se^S)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{240}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,028	0,023	0,031	0,034	0,036	0,043	0,033	0,007	21,2
0,04 mM	0,093	0,088	0,084	0,096	0,092	0,101	0,092	0,006	6,4
0,4 mM	0,162	0,169	0,161	0,135	0,150	0,150	0,155	0,012	7,8
4 mM	0,166	0,154	0,165	0,161	0,173	0,166	0,164	0,006	3,8

Priloga F6: Sprememba absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) na minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$) merjena pri encimu glutacion-peroksidaza (GPX) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) in ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

ZIM 1889 (Se^R)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{340}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,018	0,018	0,017	0,018	0,016	0,017	0,017	0,001	4,7
0,04 mM	0,019	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,001	4,7
0,4 mM	0,019	0,018	0,017	0,017	0,016	0,016	0,017	0,001	6,8
4 mM	0,019	0,019	0,017	0,017	0,017	0,017	0,018	0,001	5,8
ZIM 1878 (Se^S)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{340}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,014	0,015	0,017	0,019	0,018	0,020	0,017	0,002	13,5
0,04 mM	0,022	0,019	0,025	0,020	0,024	0,026	0,023	0,003	12,4
0,4 mM	0,032	0,030	0,032	0,030	0,032	0,035	0,032	0,002	5,8
4 mM	0,028	0,028	0,031	0,036	0,036	0,035	0,032	0,004	11,8

Priloga F7: Sprememba absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) na minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$) merjena pri encimu glutation-reduktaza (GR) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^R) ter ZIM 1878 (Se^S) v sredini eksponente faze rasti

ZIM 1889 (Se^R)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{340}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,013	0,012	0,013	0,023	0,009	0,012	0,014	0,005	35,1
0,04 mM	0,013	0,016	0,022	0,023	0,006	0,013	0,016	0,006	41,0
0,4 mM	0,015	0,015	0,018	0,024	0,009	0,014	0,016	0,005	31,3
4 mM	0,014	0,016	0,020	0,015	0,006	0,009	0,013	0,005	37,8
ZIM 1878 (Se^S)	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{340}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,006	0,007	0,006	0,007	0,006	0,008	0,007	0,001	12,2
0,04 mM	0,053	0,057	0,058	0,061	0,063	0,066	0,060	0,005	7,8
0,4 mM	0,029	0,025	0,028	0,040	0,037	0,041	0,033	0,007	20,5
4 mM	0,023	0,022	0,024	0,036	0,038	0,036	0,030	0,008	25,3

Priloga F8: Sprememba absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) na minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$) merjena pri encimu glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) v celičnem ekstraktu stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^{R}) ter ZIM 1878 (Se^{S}) v sredini eksponente faze rasti

ZIM 1889 (Se^{R})	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{340}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,262	0,264	0,249	0,246	0,256	0,265	0,257	0,008	3,1
0,04 mM	0,238	0,210	0,213	0,196	0,203	0,209	0,212	0,014	6,8
0,4 mM	0,215	0,235	0,234	0,213	0,232	0,231	0,227	0,010	4,4
4 mM	0,214	0,227	0,244	0,215	0,232	0,201	0,222	0,015	6,9
ZIM 1878 (Se^{S})	Meritve 1. gojitve			Meritve 2. gojitve			Povprečje $\Delta A_{340}/\text{min}$	SD	KV (%)
	1	2	3	1	2	3			
Kontrola	0,195	0,204	0,199	0,183	0,181	0,178	0,190	0,011	5,8
0,04 mM	0,282	0,341	0,336	0,35	0,307	0,339	0,326	0,026	8,0
0,4 mM	0,253	0,227	0,247	0,146	0,157	0,166	0,199	0,048	24,0
4 mM	0,201	0,212	0,207	0,216	0,212	/	0,210	0,006	2,9

Opomba: / - meritev ni bila izvedena

Priloga F9: Merjenje absorbance ($\lambda = 412 \text{ nm}$) pri določevanju vsebnosti glutaciona v reducirani obliki (GSH) stresane kulture (200 vrt./min, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$) kvasovke *S. pombe* seva ZIM 1889 (Se^{R}) ter ZIM 1878 (Se^{S}) v sredini eksponente faze

ZIM 1889 (Se^{R})	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve				Povprečje A_{412}/min	SD	KV (%)
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Kontrola	0,413	0,407	0,400	0,390	0,421	0,419	0,429	0,395	0,409	0,014	3,3
0,04 mM	0,430	0,419	0,578	0,402	0,406	0,397	0,390	0,373	0,424	0,064	15,2
0,4 mM	0,547	0,548	0,536	0,525	0,423	0,412	0,391	0,386	0,471	0,074	15,7
4 mM	0,532	0,525	0,516	0,508	0,420	0,410	0,400	0,382	0,462	0,064	13,8
ZIM 1878 (Se^{S})	Meritve 1. gojitve				Meritve 2. gojitve			Povprečje A_{412}/min	SD	KV (%)	
	1	2	3	4	1	2	3				
Kontrola	0,754	0,758	0,746	0,736	0,714	0,704	0,697	0,730	0,025	3,4	
0,04 mM	0,134	0,125	0,123	0,12	0,131	0,127	0,122	0,126	0,005	4,0	
0,4 mM	0,085	0,081	0,078	0,075	0,032	0,033	0,035	0,060	0,025	41,8	
4 mM	0,039	0,035	0,033	0,038	0,037	0,042	0,036	0,037	0,003	7,8	