

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Sabina OTT

**PROTEINSKE TARČE EKSTRAKTA MORSKE ALGE**  
*Fucus vesiculosus*

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Sabina OTT

**PROTEINSKE TARČE EKSTRAKTA MORSKE ALGE *Fucus vesiculosus***

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**PROTEIN TARGETS OF EXTRACT DERIVING FROM MARINE  
ALGAE *Fucus vesiculosus***

M. Sc. THESIS  
Master Study Programmes – Field: Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Biotehnologija.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila za mentorico imenovana prof. dr. Polona Jamnik, za recenzentko pa prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Članica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Sabina OTT

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Du2
DK	UDK 602.3:582.272:577.122:547.56(043)=163.6
KG	alge/ <i>Fucus vesiculosus</i> /bioaktivne snovi/polifenoli/model prebavnega trakta/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /proteomika/2D elektroforeza
AV	OTT, Sabina, dipl. bioteh. (UN)
SA	JAMNIK, Polona (mentorica)/POKLAR ULRIH, Nataša (recenzentka)
KZ	SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	PROTEINSKE TARČE EKSTRAKTA MORSKE ALGE <i>Fucus vesiculosus</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XII, 77 str., 10 pregl., 8 sl., 1 pril., 121 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Naravne bioaktivne učinkovine postajajo vse večja tarča raziskav v medicinskih strokah, saj se vse bolj pojavlja potreba po novih bioaktivnih učinkovinah. Največja skupina biološko aktivnih spojin so polifenoli. Poleg zaščite rastline pred UV in škodljivci so znane njihove antioksidativne, antikancerogene, antidiabetične, hepatoprotektivne in imunomodulatorne lastnosti. Na ekstraktih, bogatih s polifenoli so bile izvedene že številne raziskave, ki so se osredotočale na <i>in vitro</i> (DHAP, FRAP) sisteme ali živalske modele. Raziskave na <i>in vitro</i> sistemih so bile v glavnem osnovane na antioksidativnih lastnostih polifenolov, raziskave na <i>in vivo</i> sistemih pa predvsem na njihovih imunomodulatornih lastnostih. Zelo malo raziskav se je osredotočilo na enostavnejše <i>in vivo</i> modele. Raziskovalci so redko izvedli eksperimente, ki bi uporabili sistemski pristop pri raziskavi polifenolov v ekstraktih in ni veliko raziskav, ki bi upoštevale modifikacijo polifenolov v ekstraktu pri proučevanju njihovega vpliva. Zato je bil cilj raziskave s sistemskim proteomskim pristopom 2-D elektroforeze proučiti vpliv diferencialno izraženih proteinov ob tretiranju kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> z ekstraktom morske bentične alge <i>Fucus vesiculosus</i> pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta. Rezultati so pokazali, da ekstrakt vpliva na treh ravneh: ravni proteinskega aparata, vključenega v obrambo (proteini topotnega šoka, košaperoni, transkripcijski modulator Wtm1), ravni metabolizma (F <sub>1</sub> -ATPaza, fruktoza-bifosfat aldolaza) in ravni celičnega cikla (aktin, kofilin), v katerem je aktin glavna tarča vpliva. Ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta je imel večji vpliv kot intakten ekstrakt.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Du2  
DC UDK 602.3:582.272:577.122:547.56(043)=163.6  
CX algae/*Fucus vesiculosus*/bioactive compounds/polyphenols/model of the gastrointestinal system/ *Saccharomyces cerevisiae*/proteomics/2D electrophoresis  
AU OTT, Sabina  
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/ POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)  
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology  
PY 2013  
TI PROTEIN TARGETS OF EXTRACT DERIVING FROM MARINE ALGAE *Fucus vesiculosus*  
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field: Biotechnology)  
NO XII, 77 p., 10 tab., 8 fig., 1 ann., 121 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Natural bioactive compounds are becoming an increasingly interesting field of research in medicine as the need for new bioactive compounds is constantly growing. The largest group of biologically active compounds are polyphenols. As well as enabling protection against UV radiation and pests, they are known for their antioxidant, anticancerogenic, antidiabetic, hepatoprotective and immunomodulative properties. A number of studies have been done on extracts containing polyphenols, which focused on *in vitro* systems (DHAP, FRAP) or animal models. Researches on *in vitro* systems were mainly based on the antioxidant properties of polyphenols and researches on *in vivo* systems were mostly based on their immunomodulative properties. Few researches have focused on simpler *in vivo* models. Researchers have rarely done experiments, that would use a systems approach in studying polyphenol-rich extracts and not many researches have yet been acknowledged, that would include the modification of polyphenols into their influence on the model organism. That is why the aim of our study was to compare the differentially expressed proteins of *Saccharomyces cerevisiae* treated with an extract of *Fucus vesiculosus* before and after entering a model of the gastrointestinal tract, using a systems approach. The results have indicated that both extracts showed the effects on three levels: level of protein apparatus involved in the stress response (heat shock proteins, co-shaperons, transcription modulator Wtm1), metabolic level (F<sub>1</sub>-ATPase, fructose-biphosphate aldolase) and the cell cycle level (actin, cofilin) in which actin is the main target of influence. The extract after entering a model of gastrointestinal tract had a bigger influence than the intact extract.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 BIOAKTIVNE UČINKOVINE.....	2
<b>2.1.1 Sekundarni metaboliti šikimatno - korizmatne poti .....</b>	<b>4</b>
2.2 POLIFENOLI .....	5
<b>2.2.1 Zakaj polifenoli.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Definicija .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.3 Delitev .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Biosinteza fenolnih spojin-splošno .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.5 Viri polifenolov .....</b>	<b>10</b>
2.2.5.1 Alga <i>Fucus vesiculosus</i> .....	11
<b>2.2.6 Raziskave polifenolov.....</b>	<b>12</b>
2.3 KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 MATERIALI .....	18
<b>3.1.1 Kultura .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Precepljanje kulture.....</b>	<b>18</b>
3.1.2.1 Kemikalije.....	18
3.1.2.2 Aparature in oprema .....	18
<b>3.1.3 Inokulacija kulture.....</b>	<b>18</b>
3.1.3.1 Priprava materiala za inokulacijo .....	18
3.1.3.1.1 Kemikalije.....	18
3.1.3.1.2 Aparature in oprema .....	18
3.1.3.2 Inokulacija .....	19
3.1.3.2.1 Aparature in oprema .....	19
<b>3.1.4 Prenos kulture v PBS .....</b>	<b>19</b>
3.1.4.1 Priprava materiala za prenos kulture .....	19
3.1.4.1.1 Kemikalije.....	19
3.1.4.1.2 Aparature in oprema .....	19
3.1.4.2 Prenos kulture v PBS .....	19

3.1.4.2.1	Kemikalije.....	19
3.1.4.2.2	Aparature in oprema .....	20
<b>3.1.5</b>	<b>Priprava ekstrakta .....</b>	<b>20</b>
3.1.5.1	Kemikalije.....	20
<b>3.1.6</b>	<b>Tretiranje kulture .....</b>	<b>20</b>
3.1.6.1	Aparature in oprema .....	20
<b>3.1.7</b>	<b>Pobiranje vzorcev .....</b>	<b>20</b>
3.1.7.1	Kemikalije.....	20
3.1.7.2	Aparature in oprema .....	20
<b>3.1.8</b>	<b>Diferencialna detergentna frakcionacija.....</b>	<b>20</b>
3.1.8.1	Kemikalije.....	20
3.1.8.2	Aparature in oprema .....	21
<b>3.1.9</b>	<b>Preverjanje koncentracije ekstrahiranih proteinov mitohondrijske frakcije (metoda po Bradfordu) .....</b>	<b>21</b>
3.1.9.1	Kemikalije.....	21
3.1.9.2	Aparature in oprema .....	21
<b>3.1.10</b>	<b>Prva dimenzija 2-D elektroforeze .....</b>	<b>21</b>
3.1.10.1	Rehidracija trakov.....	21
3.1.10.1.1	Kemikalije.....	21
3.1.10.1.2	Aparature in oprema .....	21
3.1.10.2	Izoelektrično fokusiranje .....	22
3.1.10.2.1	Kemikalije.....	22
3.1.10.2.2	Aparature in oprema .....	22
<b>3.1.11</b>	<b>Druga dimenzija 2-D elektroforeze .....</b>	<b>22</b>
3.1.11.1	Vlivanje gelov.....	22
3.1.11.1.1	Kemikalije.....	22
3.1.11.1.2	Aparature in oprema .....	22
3.1.11.2	Uravnoteženje trakov .....	23
3.1.11.2.1	Kemikalije.....	23
3.1.11.2.2	Aparature in oprema .....	23
3.1.11.3	SDS-PAGE elektroforeza .....	23
3.1.11.3.1	Kemikalije.....	23
3.1.11.3.2	Aparature in oprema .....	23
<b>3.1.12</b>	<b>Barvanje 2-D gelov s SYPRO Ruby barvilom.....</b>	<b>23</b>
3.1.12.1	Kemikalije.....	23
3.1.12.2	Aparature in oprema .....	24
<b>3.1.13</b>	<b>Slikanje gelov .....</b>	<b>24</b>
3.1.13.1	Aparature in oprema .....	24
<b>3.1.14</b>	<b>Analiza gelov in identifikacija diferencialno izraženih proteinov .....</b>	<b>24</b>
3.1.14.1	Aparature in oprema .....	24
<b>3.1.15</b>	<b>Izrez diferencialno izraženih proteinov.....</b>	<b>24</b>
3.1.15.1	Aparature in oprema .....	24
3.2	METODE.....	24
<b>3.2.1</b>	<b>Precepljanje kulture.....</b>	<b>24</b>

<b>3.2.2</b>	<b>Inokulacija kulture.....</b>	<b>24</b>
3.2.2.1	Priprava materiala za inokulacijo .....	24
3.2.2.2	Inokulacija kulture .....	25
<b>3.2.3</b>	<b>Prenos kulture v PBS .....</b>	<b>25</b>
3.2.3.1	Priprava materiala za prenos kulture .....	25
3.2.3.2	Prenos kulture v PBS .....	26
<b>3.2.4</b>	<b>Priprava ekstraktov .....</b>	<b>26</b>
3.2.4.1	Nabiranje primerkov <i>Fucus vesiculosus</i> .....	26
3.2.4.2	Priprava ekstrakta .....	26
3.2.4.3	Izpostavitev ekstrakta TNO-modelu prebavnega trakta (TIM-1) (angl. <i>TNO-in vitro gastrointestinal model</i> ).....	27
<b>3.2.5</b>	<b>Tretiranje kulture .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Pobiranje vzorcev.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Diferencialna detergentna frakcionacija.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Preverjanje koncentracije ekstrahiranih proteinov mitohondrijske frakcije (metoda po Bradfordu) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Prva dimenzija 2-D elektroforeze .....</b>	<b>30</b>
3.2.9.1	Rehidracija trakov.....	31
3.2.9.2	Izoelektrično fokusiranje .....	31
<b>3.2.10</b>	<b>Druga dimenzija 2-D elektroforeze .....</b>	<b>32</b>
3.2.10.1	Vlivanje gelov.....	32
3.2.10.2	Uravnoteženje trakov.....	33
3.2.10.3	SDS-PAGE elektroforeza .....	34
<b>3.2.11</b>	<b>Barvanje 2-D gelov s SYPRO Ruby barvilom.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.12</b>	<b>Slikanje gelov .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.13</b>	<b>Analiza gelov in identifikacija diferencialno izraženih proteinov .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.14</b>	<b>Izrez diferencialno izraženih proteinov.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.15</b>	<b>Bioinformacijska obdelava podatkov .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>39</b>
4.1	KONCENTRACIJE EKSTRAHIRANIH PROTEINOV MITOHONDRIJSKE FRAKCIJE.....	39
4.2	SLIKE GELOV Z DIFERENCIALNO IZRAŽENIMI ELEKTROFORETSKIMI LISAMI .....	40
4.3	PREGLEDNICA Z REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE .....	43
4.4	REZULTATI BIOINFORMACIJSKE OBDELAVE .....	44
4.5	SLIKA PROTEINSKIH INTERAKCIJ (STRING) .....	47
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>50</b>
5.1	PROTEIN TOPLITNEGA ŠOKA ST1 (KOŠAPERON) .....	50
5.2	PROTEIN TOPLITNEGA ŠOKA 70 kDa (Hsp70) .....	53
5.3	TRANSKRIPCIJSKI MODULATOR WTM 1 .....	56
5.4	F <sub>1</sub> - ATPaza β PODENOTA .....	58
5.5	PEPTIDIL/PROLIL-CIS/TRANS IZOMERAZA CPR6 (CIKLOFILIN).....	59
5.6	AKTIN .....	60
5.7	FRUKTOZA-BIFOSFAT ALDOLAZA .....	62

5.8	KOFILIN-1 .....	63
5.9	CELOKUPNI VPLIV EKSTRAKTA PRED IN PO PREHODU SKOZI MODEL PREBAVNEGA TRAKTA .....	64
5.10	MOŽNOSTI IN IDEJE ZA NADALJNJE RAZISKAVE .....	65
5.11	APLIKACIJE POLIFENOLOV .....	66
<b>6</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>70</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

**KAZALO PREGLEDNIC**

	Str.
Preglednica 1: Skupine fenolnih spojin glede na število ogljikovih atomov in ogljikov skelet z navedenimi primeri (Dey in Harborne, 1997).....	4
Preglednica 2: Ekstrakti, uporabljenimi pri tretiranju z njihovimi oznakami, začetnimi koncentracijami, končnimi koncentracijami glede in odpipetiran volumen ekstrakta glede na volumen celične suspenzije .....	28
Preglednica 3: Sestava pufra za rehidracijo.....	31
Preglednica 4: Sestava raztopine za poliakrilamidni gel .....	33
Preglednica 5: Sestava 50 mL osnovnega pufra za uravnoteženje .....	34
Preglednica 6: Sestava 5xSDS raztopine.....	34
Preglednica 7: Rezultati meritve koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu .....	39
Preglednica 8: Rezultati t-testa, razmerje normaliziranih volumnov (NVR) s pripadajočo številko elektroforetske lise, ki je skupna vsem biološkim ponovitvam (MACH) in posamezni biološki ponovitvi (SPN).....	43
Preglednica 9: Protein pod zaporednim številom ujemanja, njegovi pripadajoči teoretični in pridobljeni pI, Mw in pripadajoči odstotek homologije s človeškim proteinom .....	44
Preglednica 10: Oznaka proteina v interakcijski mreži STRING, njegovo ime in funkcija .....	48

**KAZALO SLIK**

	Str.
Slika 1: Biosinteza polifenolov (Dewick, 2002) .....	8
Slika 2: Biosinteza polifenolov-nadaljevanje (Dewick, 2002).....	9
Slika 3: <i>Fucus vesiculosus</i> (FSC, 2013) .....	11
Slika 4: Shema celotnega poteka dela magistrske naloge .....	17
Slika 5: Analiza gelov s programom 2-D Dymension (Syngene), prikazan je primer lise s številko ujemanja 10; združevanje gelov slepih vzorcev in vzorcev ekstraktov po prehodu skozi model prebavnega trakta.....	37
Slika 6: Proteinski profil kvasovke po izpostavitvi ekstraktom: A) ozadje ekstrakta (S), B) ekstrakt pred prehodom skozi model prebavnega trakta (ZS), C) ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta (DS), D) kontrola (PBS) (K) .....	41
Slika 7: Reprezentativni proteomski profil kvasovke ob izpostavitvi ekstraktom: A) ozadje ekstrakta (S), B) ekstrakt pred prehodom skozi model prebavnega trakta (ZS), C) ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta (DS) .....	42
Slika 8: Interakcije diferencialno izraženih proteinov ob tretiranju kvasovke <i>S. cerevisiae</i> z ekstraktoma, pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta in njihovi funkcionalni partnerji (Von Mering in sod., 2003) .....	47

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Botanični vrt, 2013)

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS-	2,2'-azino-bis(3-etylbenztiazolin-6-sulfonska kislina) (angl. 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
APS-	amonijev persulfat (angl. ammonium persulphate)
ATP -	adenozin trifosfat (angl. adenosine triphosphate)
BFM-	bromofenol modro barvilo (angl. bromophenol blue)
CHAPS-	3-[3-kolamidopropil]dimetilamonio]-1-propansulfonat (angl. 3-[3-cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CoA -	koencim A (angl. coenzyme A)
DMEM-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH-	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (angl. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
DS-	vzorec po prehodu skozi model prebavnega traka (angl. digested sample)
DTT-	ditioreitol (angl. dithiothreitol)
FRAP-	antioksidativna moč redukcije železa (angl. Ferric Reducing Antioxidant Power)
FT-IR-	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
HDL-	lipoproteini velike gostote (angl. high density lipoproteins)
HMG-CoA-	β-hidroksi-β-metil glutaril-CoA (angl. β-hydroxy-β-methyl glutaryl-CoA)
HPLC-	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)
K-	imobiliziran pH gradient (angl. Immobilized pH gradient)
LDL-	kontrolni vzorec (angl. control sample)
MS-	lipoproteini majhne gostote (angl. low density lipoproteins)
MTT-	masna spektrometrija (angl. Mass Spectrometry)
NAD+	3, 4, 5-dimetiltiazol- 2, 5 difenill tetrazolijev bromid (angl. 3, 4, 5 dimethylthiazol- 2, 5 diphenyl tetrazolium bromide)
NADH+H+-	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirana oblika) (angl. nicotinamide adenine dinucleotide) (angl. oxidized form)
OD-	nikotinamid adenin dinukleotid (reducirana oblika) (angl. nicotinamide adenine dinucleotide) (angl. reduced form)
PAF-	optična gostota (angl. Optical Density)
PAGE-	dejavnik aktivacije krvnih ploščic (angl. platelet activating factor)
PBS-	poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
S-	fosfatni pufer z NaCl (angl. Phosphate Buffer Saline)
SAH-	slepi vzorec (angl. blank sample)
SAM-	slipi vzorec (angl. blank sample)
SDS-	S-adenozil homocistein (angl. S-adenosyl homocysteine)
TCA –	S-adenozil metionin (angl. S-adenosyl methionine)
TEMED-	natrijev dodecilsulfat (angl. sodium dodecylsulphate)
TIM-	trikarboksilatni cikel ali cikel citronske kisline (angl. tricarboxylic acid cycle or citric acid cycle)
TPR-	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (angl. N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine)
TPTZ-	TNO- in vitro gastrointestinalni model (angl. TNO- in vitro gastrointestinal model)
Tris-	Tetratrikopeptidna ponovitev (angl. tetratricopeptide repeat)
VLDL-	železov tripiridiltirazin (angl. ferric tripyridiltripazine)
WBSSH-	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (angl. 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
x-	lipoproteini zelo majhne gostote (angl. very low density lipoproteins)
y-	White, Bate-Smith, Swain, Haslam
YEPD-	koncentracija redčenih celokupnih proteinov
ZIM-	razlika med povprečno absorbanco testnega in kontrolnega vzorca
ZS-	kvasni ekstrakt, pepton, dekstroza (angl. Yeast Extract, Peptone, Dextrose)
	Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov
	vzorec pred prehodom skozi model prebavnega traka (angl. zero sample)

## 1 UVOD

Danes postaja živjenjski standard vse teže razložljiva komponenta človeštva, saj se kljub povzpenjanju tehnologije in odpiranju novih teorij na področju znanosti; posebej v veji medicine; splošno zdravje ni izboljšalo. Številnost in raznolikost bolezni se strmo širita, frekvenca obolelosti ne kaže optimističnih rezultatov. Diabetes, ateroskleroza, srčno-žilne bolezni, bolezni ledvic, bolezni jeter in rak so bolezni sodobnega časa, ki pestijo družbo. Medicina konstantno išče nove rešitve, ki bi z ekonomskega in trajnostnega predstavljalje vidika boljšo pot do zdravilnih učinkovin (Park in sod., 2012). Ravno bioaktivne učinkovine iz naravnih virov, ki hkrati predstavljajo biorazgradljiv material, danes predstavljajo eno najbolj obetavnih rešitev. Rešitev namreč vklaplja sinergistične učinke večih skupin bioaktivnih učinkovin v sistem prehrambenih in farmakoloških vrednosti pripravkov. Zdravstvene prednosti združuje z varstvom okolja in ekonomiko procesa prodobivanja (Andrade in sod., 2013). Zato medicina vse bolj poudarja pomen vključevanja bioaktivnih učinkovin v prehrano kot prehranske dodatke. Intenzivne raziskave so namenjene detekciji novih bioaktivnih učinkovin v ekstraktih rastlin, ki jih lahko vključimo v vsakodnevne prehranjevalne navade (Katalinic in sod., 2006).

### 1.1 NAMEN DELA

Ker se danes odvijajo številne raziskave z namenom odkritja novih potencialnih bioaktivnih učinkovin, je namen magistrskega dela raziskati polifenole kot bioaktivne učinkovine. Do sedaj je bilo zaslediti malo raziskav, ki bi na enostavnem evkarionskem organizmu s sistemskim pristopom raziskali vpliv ekstraktov. Redke so tudi raziskave, ki vključujejo modifikacijo ekstrakta ob prehodu skozi prebavni trakt. Zato je cilj dela s sistemskim proteomskim pristopom 2-D elektroforeze na modelnem organizmu *S. cerevisiae* raziskati vpliv s polifenoli bogatega ekstrakta *F. vesiculosus* na diferencialno izražanje proteinov. Pričakujemo vidno razliko v proteinskem profilu kvasovke *S. cerevisiae* po delovanju ekstrakta alge pred in po prehodu skozi modelni sistem gastrointestinalnega trakta. Preko proteinskih tarč bomo spoznali mehanizem delovanja ekstrakta v celici in s tem možnosti za uporabo alg v različnih aplikacijah.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIOAKTIVNE UČINKOVINE

Vsak organizem za dopolnitev lastnega življenjskega cikla, torej za preživetje, rast in reprodukcijo, potrebuje specifičen set metabolitov (Dewick, 2002). Sintetizira pa tudi metabolite, ki niso nujno potrebni za njegovo delovanje. Njihov ključni pomen še ni popolnoma razumljen, vendar po vsej verjetnosti leži v komunikaciji med celicami, med tkivi in med organizmi. Glavno vlogo lahko odigrajo bodisi pri odnosih sožitja, priskledništva in zajedalstva. Te metabolite imenujemo bioaktivne učinkovine. Za sintezo nabora vseh metabolitov v celici je odgovorna integrirana mreža encimsko posredovanih kemijskih reakcij, ki jih imenujemo intermediarni metabolizem. Sestavljata ga dva hierarhična, med seboj sodelujoča sklopa; primarni in sekundarni metabolizem. Naravne bioaktivne učinkovine lahko izvirajo iz obeh tipov metabolizma.

Primarni metabolizem celico oskrbi z gradniki za polimerne gradbene enote, ki jo sestavlja (Dewick, 2002). Vsaka od polimernih enot je zgrajena iz pripadajoče monomerne enote; pri proteinih so to aminokisline, pri ogljikovih hidratih so monosaharidi, pri lipidih glicerol in maščobne kisline, pri nukleinskih kislinah pa nukleotidi. Vse monomerne enote za izgradnjo osnovnih celičnih gradbenih enot so pridobljene z rekonstrukcijo in modifikacijo ogljikovega skeleta enega ali večih izmed dvanajstih ključnih metabolitov (glukoza -6-fosfat, fruktoza-6-fosfat, dihidroksiaceton fosfat, 3-fosfoglicerat, fosfoenolpiruvat, piruvat, acetil-CoA,  $\alpha$ -ketoglutarat, sukcinil-CoA, oksaloacetat, riboza-5-fosfat in eritroza-4-fosfat), ki izvirajo iz treh centralnih metabolnih poti; glikolize, pentoza-fosphate poti (in njenih variacij; fosfoketolazne poti in Entner-Doudoroffove poti), in TCA cikla. Vseh dvanajst ključnih metabolitov pa se pridobi iz primarnega oz. specifičnega seta virov ogljika, ki so bodisi organskega ali anorganskega izvora. Ker so polimerne enote na entalpijsko višjem nivoju, kot monomerne enote, se ob izgradnji polimerov kot gradbenih enot celice v kemijske veže energija. Energija se meri v ATP ekvivalentih in se pridobi s pomočjo oksidoreduksijskih reakcij (v primarnem metabolizmu), reakcij oddajanja elektronov s strani glavnega vira elektronov, ki je lahko reducirana molekula organskega ali anorganskega izvora, in reakcij sprejemanja elektronov s strani glavnega oksidanta, ki je  $\text{NAD}^+$ . Pri tem se  $\text{NAD}^+$  pretvori v  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , ki je glavni reducent v celici.  $\text{NAD}^+$  se reciklira z redukcijo glavnega sprejemnika elektronov, ki je lahko kisik (aerobno dihanje) ali druga anorganska molekula (anaerobno dihanje); v tem primeru se ATP ekvivalent pridobi z oksidativno fosforilacijo s pomočjo encima ATP-sintaze, lahko pa je organska molekula (v reakcijah fermentacije); v tem primeru se ATP pridobi s substratno fosforilacijo. Celica za pridobivanje monomernih enot za sintezo gradbenih enot torej potrebuje tri elemente: vir ogljika, ki se preko integriranega encimskega spleta pretvori v dvanajst ključnih metabolitov, vir elektronov in vir energije. Kemoorganotrofi pridobijo vse tri elemente v organskih molekulah, kot so glukoza, laktat, manitol, sorbitol. Kemolitotrofi pa pridobijo vir elektronov in energije iz reduciranih anorganskih molekul, kot glavni vir ogljika pa izkoristijo ogljikov dioksid. Avtotrofi kot vir energije izkoristijo svetlobo, kot vir elektronov anorgansko molekulo, kot je voda (oksigena

fotosinteza) ali divodikov sulfid (anoksigena fotosinteza), kot vir ogljika pa ogljikov dioksid. Integriran metabolni splet pretvarjanja virov ogljika, energije in elektronov v dvanajst ključnih metabolitov in energijo imenujemo katabolne reakcije. Vseh dvanajst ključnih metabolitov pa je vključenih v integriran splet metabolnih reakcij, v katerih se tvorijo osnovne celične gradbene enote (proteini, lipidi, ogljikovi hidrati in nukleinske kisline) in porablja energija, imenovanih anabolne reakcije. Anabolne reakcije so sklopljene s katabolnimi reakcijami (Dewick, 2002).

Poleg primarnega metabolizma, ki generira metabolite, ki so široko razširjeni v organizmih, organizmi izvajajo tudi splet metabolnih poti, ki generirajo metabolite, ki so redko zastopani v organizmih, pravzaprav so lahko specifični le za določeno skupino organizmov, ki jih proizvaja zgolj pod določenimi biotskimi in abiotskimi pogoji (Dewick, 2002). Omenjene metabolite imenujemo sekundarni metaboliti, metabolizem pa sekundarni metabolizem. Vsak od sekundarnih metabolitov izvira iz enega ali večih produktov primarnega metabolizma, iz dvanajstih ključnih metabolitov. Večina sekundarnih metabolitov izvira iz štirih gradbenih enot; acetil-CoA, šikimska kislina, mevalonat in deoksiksiloza-5-fosfat. Omenjene gradbene enote se sintetizirajo po acetatni, šikimatni, mevalonatni (biosinteza maščobnih kislin) in deoksiksiloza fosfatni metabolni poti. Acetil - CoA nastane z oksidativno dekarboksilacijo piruvata, enega izmed produktov glikolize. Lahko pa nastane tudi z  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin. Pomembni sekundarni metaboliti, ki izvirajo iz acetatne poti so fenoli, prostaglandini, makrolidni antibiotiki in številne maščobne kisline na prehodu med primarnim in sekundarnim metabolizmom. Šikimska kislina nastane po šikimatno-korizmatni poti z aldolno kondenzacijo eritroze-4-fosfata in fosfoenolpiruvata v 3-deoksi-arabino-heptulosonat-7-fosfat. Šikimatno-korizmatna pot je glavna metabolna pot za sintezo sekundarnih metabolitov, kot so fenolne spojine, derivati cimetne kisline, lignanov in alkaloidov. Mevalonatna pot se prekriva s potjo biosinteze maščobnih kislin iz acetil-CoA, vendar preusmeri acetil-CoA v druge sekundarne metabolite, kot acetatna pot. Deoksiksiloza-fosfatna pot zajema nastanek deoksiksiloze-5-fosfata iz gliceraldehida-3-fosfata in piruvata. Deoksiksiloza-5-fosfat je gradbena enota za nastanek številnih steroidov in terpenoidov kot sekundarnih metabolitov. Številni sekundarni metaboliti pa se sintetizirajo s kombiniranjem osnovnih gradbenih enot in produktov štirih osnovnih metabolnih poti, kar bistveno poveča diverziteto oz. številčnost družin sekundarnih metabolitov (Dewick, 2002).

### 2.1.1 Sekundarni metaboliti šikimatno - korizmatne poti

Šikimatno-korizmatna pot je glavna pot za sintezo L-fenilalanina in L-tirozina, ki sta glavna prekurzorja za sintezo številnih sekundarnih metabolitov, predvsem fenolnih spojin. Številni avtorji zagovarjajo različne delitve fenolnih spojin, ena izmed njih je glede na število ogljikovih atomov v ogljikovem skeletu (Dey in Harborne, 1997). Preglednica 1 prikazuje skupine fenolnih spojin glede na število ogljikovih atomov (Preglednica 1).

Preglednica 1: Skupine fenolnih spojin glede na število ogljikovih atomov in ogljikov skelet z navedenimi primeri (Dey in Harborne, 1997)

Število ogljikovih atomov	Ogljikov skelet	Razred fenolne spojine	Primer fenolne spojine
6	C <sub>6</sub>	Enostavni fenoli	Hidrokinon, katehol
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Hidroksibenzoati	4-hidroksibenzoat
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenoni Fenilacetati	4-hidroksiacetofenon 4-hidroksifenilacetat
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hidroksicinamati Fenilpropeni Kumarini Kromoni	Kafeat Eugenol Eskuletin 2-Metil-5-hidroksi-7-metoksikromon
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftokinoni	Juglon
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni	1,3,6,7-hidroksiksanton
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbeni Antrakinoni	Resveratrol Emodin
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidi	Kvercetin
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignani	Pinoresinol
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoidi	Amentoflavon
n	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> (C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub> :Glc (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Katehol melanini Hidrolizabilni tanini Lignini	Polimer naftalena Galotanini Gvajacil lignin, Gvajacil-siringil lignini Polimeri katehina
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Kondenzirani tanini	

## 2.2 POLIFENOLI

### 2.2.1 Zakaj polifenoli

Zanimivo vprašanje je, zakaj sploh raziskovati polifenole kot bioaktivne učinkovine. Izmed vseh bioaktivnih učinkov imajo polifenoli najširši nabor pozitivnih učinkov na organizem. Upravičeno so zato vsestranske bioaktivne učinkovine. Kot sekundarni metaboliti omogočajo rezistenco rastlin na mikrobne patogene in odigrajo ključno vlogo pri obrambi rastlin proti rastlinojedom. Rastlinam omogočajo zaščito pred UV sevanjem (Quideau in sod., 2011). Znani so njihovi antimikrobni (antibakterijski, protiglivni in protivirusni) učinki (Rahman, 2008). Vse bolj odmevno je tudi njihovo antikancerogeno delovanje z usmerjanjem citotoksičnosti, inhibicijo proliferacije, indukcijo apoptoze ali lovljenjem reaktivnih kisikovih zvrsti. So tudi dobre protivnetne in imunomodulatorne učinkovine. Kot eni najmočnejših antioksidantov lovijo reaktivne kisikove zvrsti ali vplivajo na encime odgovorne za odpravljanje oksidativnega stresa. V ospredje prihajajo tudi njihove nevroprotективne, antidiabetične, hepatoprotективne in spazmolitične aktivnosti. Poleg tega preprečujejo strjevanje krvi (Rahman, 2008). Zato postajajo polifenoli vse bolj aktualni predvsem kot prehranski dodatek v živilski industriji in v medicini.

### 2.2.2 Definicija

Z medicinskega aspekta ena najbolj zanimivih bioaktivnih učinkovin so zagotovo polifenoli. Polifenoli so ena najbolj raznolikih skupin bioaktivih učinkovin. Zaznamujejo jih molekule s širokim spektrom strukturnih lastnosti, ki se lahko uvrstijo v različne skupine glede na način delitve, ki jo izberemo. Oblikovanih je bilo več definicij polifenolov na podlagi različnih teoretičnih kriterijev za uvrstitev v skupino, saj zaradi pestre zgodovine dolgo ni bilo doseženega dogovora. Skupina polifenolov se je nekdaj imenovala skupina rastlinskih taninov (Quideau in sod., 2011). Izraz se je prvič uporabil v enciklopediji *Historia Plantarum*, delu Theoprastusa iz mesta Eressus. Večina raslinskih ekstraktov se je namreč uporabila za proces strojenja kože. Z leti so tako s strani proizvodnje, predvsem v industriji usnja, kot s strani raziskav in razvoja intenzivno pridobivali na popularnosti. V sosledju z razvojem industrije usnja, so predvsem kemike zanimale komponentne sestave posameznih rastlinskih ekstraktov in metode izolacije posameznih kemijskih komponent iz surovega ekstrakta. S širjenjem znanja o problematiki rastlinskih taninov je njihova strukturalna in funkcionalna kompleksnost na molekularnem nivoju postajala vedno bolj jasna. Postali so glavna prioriteta analitske organske kemije. Študija rastlinskih taninov je razširila področja njihovih aplikacij na različnih področjih komercialnega interesa. Hkrati se je ožala njihova osnovna definicija. Izraz tanin se je začel uporabljati striktno za molekule z molekulsko maso med 500 in 3000 Da z zadostnim številom fenolnih skupin, ki oblikujejo medmolekulske vezi s kolagenom v procesu strojenja kože (Quideau in sod., 2011). So pa tudi molekule, ki so strukturno enostavnejše od taninov. Omenjene molekule izražajo latnosti polifenolov, kot je tvorba kompleksov z železovimi solmi, vendar ne kompleksirajo s kolagenom in ne sodelujejo v procesu rjavenja. Oblikoval se je zaključek, da so vsi tanini polifenoli, ne velja pa recipročna trditev. V drugi svetovni vojni so polifenoli postali področje intenzivnih raziskav. Področja so se razširila na kategorije

kmetijstva, ekologije, živilstva in medicine. Postajali so vse pomembnejši kot bioaktivne učinkovine. Prve izsledke izraza rastlinski polifenoli so vidni v delu Theodora White. Začetno definicijo polifenolov sta leta 1962 postavila fitokemika E.C. Bate-Smith in Tony Swain kot variacijo definicije Theodora White. Polifenole sta definirala kot "vodotopne fenolne komponente z molekulsko maso 300-5000 Da, ki so poleg vključnosti v standardne fenolne reakcije sposobni precipitirati alkaloide, želatino in ostale proteine iz raztopine". Edwin Haslam je kemijsko strukturo polifenolov nekoliko natančneje opredelil kot molekule z dvanajstimi do šestnajstimi hidroksilnimi skupinami na petih do sedmih aromatskih obročih. Tako se je oblikovala končna definicija polifenolov znana kot WBSSH definicija (White, Bate-Smith, Swain, Haslam). WBSSH definicija sicer opredeljuje bistvene lastnosti polifenolov, izključi pa številne enostavnejše fenolne molekule, ki lahko esterificirajo v poliole in se obnašajo kot polifenoli. Po drugi strani pa številne molekule vsebujejo več kot eno fenolno komponento, so kemijsko podobne polifenolom, niso pa vključene v zanje značilne reakcije in nimajo njihovih tipičnih lastnosti. Takšen primer so terpeni. Zato se je pojavila širša definicija polifenolov kot rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki izvirajo izključno iz šikimatne poti in/ali acetatne poti, ki vsebujejo več kot en fenolni obroč, na katerega ni pripeta nobena od skupin z dušikovim atomom (Quideau in sod., 2011).

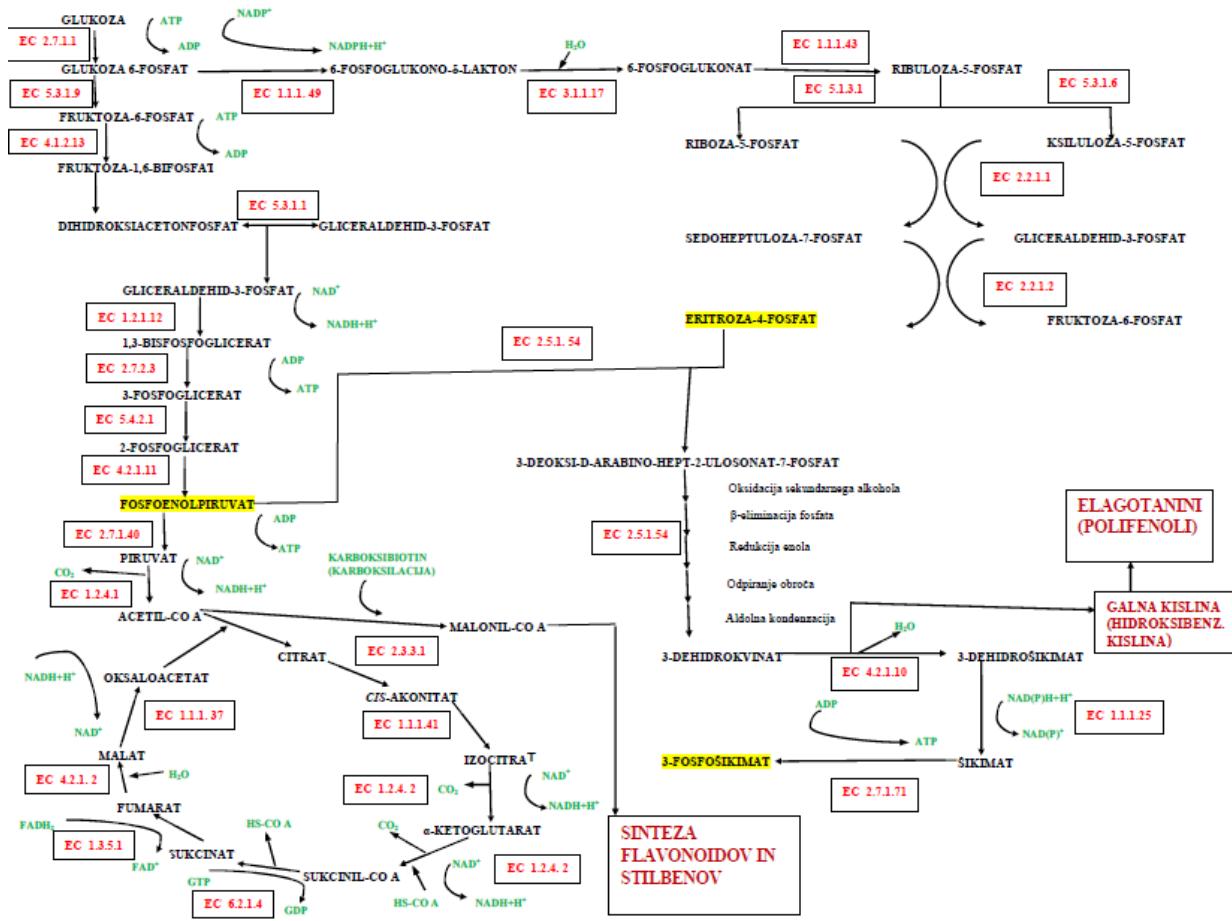
### 2.2.3 Delitev

Znanstveniki zaradi strukturnih raznolikosti fenolnih spojin še vedno niso dosegli enotnega dogovora o njihovi delitvi, niti o natančni ločnici med fenolnimi spojinami in polifenoli. Zato njihova delitev zavisi od stroke, ki se z njimi ukvarja. Številni avtorji so privzeli različne principe delitve. WBSSH definicija polifenolov bi zajela predvsem tri osnovne razrede polifenolov, vsi trije pa sodijo v razred taninov: *proantocianidini*, ki sodijo v podskupino kondenziranih taninov, galotanini, elagitanini, oboji sodijo v skupino hidrolizabilnih taninov in florotanini (Quideau in sod., 2011). Nekoliko razširjena definicija, ki jo zajema skupina D'Archivio in sod. (2007) pa deli polifenole na štiri osnovne skupine: flavonoidi, fenolne kisline, fenolni alkoholi, stilbeni in lignani (D'Archivio in sod., 2007). Flavonoidom ( $C_6-C_3-C_6$ ) sta skupna dva benzenova obroča, ki ju združuje centralni piranski obroč. Delimo jih na šest podskupin glede na oksidacijsko stanje benzenovih obročev: flavonoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni, antocianidini in flavanoli. Najbolj znan predstavnik flavonolov je kvercetin. Flavoni so v rastlinah največkrat v polimetoksilirani obliki. Njihov tipični predstavnik je apigenin. Flavanoni so običajno v glikozilirani obliki z disaharidom. Naringenin velja za njihovega glavnega predstavnika. Izoflavoni so strukturno podobni estrogenom, zato se jih klasificira kot fitoestrogene. Kot glavna predstavnika se lahko navedeta genistein in daidzein (D'Archivio in sod., 2007). Antocianini so znani vodotopni pigmenti, ki se v rastlinah najpogosteje nahajajo v glikozilirani obliki kot antocianidini. Flavanoli zajemajo v glavnem dve podskupini; katehine in njihove dimere ali polimere-proantocianidine, ki jih lahko uvrstimo tudi med kondenzirane tanine. Fenolne kisline zajemajo dva podrazreda; hidroksibenzojske kisline ( $C_6-C_1$ ) in hidroksicimetne kisline ( $C_6-C_3$ ), ki nastanejo s hidroksilacijo benzojskih in cimetnih kislin. Med hidroksibenzojske kisline sodi galna kislina, eden ključnih predstavnikov galotaninov (D'Archivio in sod., 2007). Z biosintetsko postopno oksidacijo nato dobimo elagitanine (Quideau, 2009). Obe podskupini hidroksibenzojskih

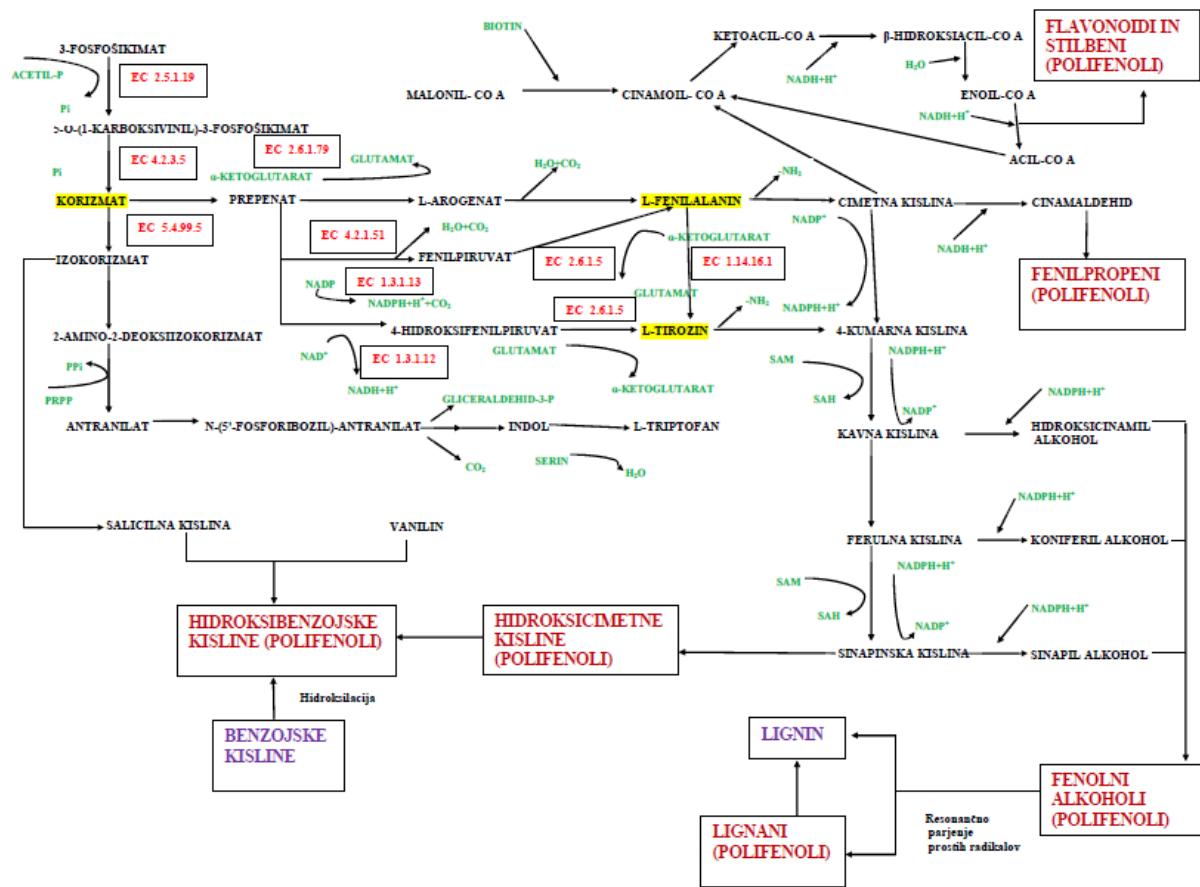
kislin sodita med hidrolizabilne tanine. Med glavne predstavnike hidroksicimetnih kislin štejemo 4-kumarno, kavno, ferulno kislino in sinapinsko kislino, ki jih večinoma najdemo zaestrene s šikimsko kislino ali tartratom (D'Archivio in sod., 2007). Hidroksicimetne kisline so prekurzorji hidroksibenzojskih kislin. Fenolni alkoholi nastanejo z redukcijo hidroksicimetnih kislin. Z redukcijo 4-kumarne kisline nastane 4-hidriksicinamilalkohol, z redukcijo ferulne kisline nastane koniferil alkohol, z redukcijo sinapinske kisline pa nastane sinapil alkohol. Z oksidativno dimerizacijo dveh fenilpropanskih enot fenolnih alkoholov nastanejo lignani, z njihovo polimerizacijo (ali radikalско reakcijo lignanov) pa lignin. Stilbeni so zadnja skupina polifenolov, ki se tako, kot nekateri ostali, v rastlinah nahajajo v glikozilirani obliki (D'Archivio in sod., 2007). Dey in Harborne (1997) pa zagovarjata delitev fenolnih spojin na splošno glede na ogljikov skelet (Dey in Harborne, 1997) (Preglednica 1).

#### 2.2.4 Biosinteza fenolnih spojin-splošno

Polifenoli so strukturno in funkcionalno variabilne molekule, saj izvirajo iz različnih hierarhičnih stopenj metabolne sinteze. Glavni poti za sintezo polifenolov sta acetatna pot in šikimatno-korizmatna pot. Za izvedbo celotne poti biosinteze sta potrebna dva od dvanajstih ključnih metabolitov; eritroza-4-fosfat in fosfoenolpiruvat. Z aldolno kondenzacijo se združita v 3-deoksi-D-arabinoheptulozonat-7-fosfat, ki se v petstopenjski reakciji pretvori v dehidrovinat, prekurzor korizmata. Korizmat je ključen metabolit, ki preko pretvorbe v prepenat generira dve glavni aminokislini; L-fenilalanin in L-tirozin. Za nastanek vsake od obeh aminokislin stopnji oksidacije (L-tirozin) oz. dehidracije (L-fenilalanin) sledi stopnja transaminacije. Aminokislini sta glavna prekurzorja večine polifenolov, nekatere hidroksibenzojske kisline pa se odcepijo bolj zgodaj v šikimatno-korizmatni poti. V nadaljnji fazi mora steći deaminacija obeh aminokislin. Deaminacija tirozina vodi v nastanek hidroksicimetnih kislin, deaminacija L-fenilalanina vodi v nastanek cimetne kisline, ki lahko hidrosilira v hidroksicimetne kisline ali pa se vključi v acetatno pot biosinteze. Vključevanje cimetne kisline v acetatno pot biosinteze vodi v nastanek flavonoidov in stilbenov. Hidroksicimetne kisline z redukcijo tvorijo fenolne alkohole, ki so prekurzorji lignanov in lignina, hkrati pa so prekurzorji hidroksibenzojskih kislin. Slika 1 in 2 shematsko povzema sistem sinteze polifenolov (Slika 1 in Slika 2).



Slika 1: Biosinteza polifenolov (Dewick, 2002)



Slika 2: Biosinteza polifenolov-nadaljevanje (Dewick, 2002)

## 2.2.5 Viri polifenolov

Ključno vprašanje je, kateri naravni vir predstavlja s polifenoli najbolj bogat vir bioaktivnih učinokovin in, kateri organizem bi bil najprimernejši za raziskavo celotnega spektra vplivov polifenolov. Polifenoli so kot bioaktivne učinkovine prisotni v številnih rastlinah (D'Archivio in sod., 2007; Albert in sod., 2011; Saarinen in sod., 2005; Quideau, 2009). Priloga A prikazuje nekatere izmed virov, bogatih s polifenoli (Priloga A).

Kot pomemben vir polifenolov pa se lahko štejejo tudi alge, saj predstavljajo obilen vir raznolikih bioaktivnih učinkovin (sekundarnih metabolitov), ki s polifenoli sinergistično učinkujejo. Širši profil bioaktivnih učinkovin v organizmu pripelje do večjega števila reakcij s polifenoli in s tem do poudarjenega vpliva polifenolov. Alge so zato kot organizmi zanimivi za raziskavo in izolacijo polifenolov (El Gamal, 2010). So preprosti organizmi s celičnimi enotami povezanimi v kolonije in širokim razponom velikosti od 3 µm do 70 m (El Gamal, 2010). Zato jih lahko uvrstimo v dve skupini, mikroalge in makroalge. Mikroalge zajemajo diatomeje (*Bacillariophyceae*), dinoflagelate (*Pyrrhophyta*), zelene in rumeno-zelene flagelate (*Prasino-phyta*; *Prymnesiophyta*; *Cryprophyta*, *Chrysophyta* in *Rhaphidiophyta*) in modrozelene cepljivke ali cianobakterije (*Cyanophyta*). Makroalge so razdeljene na tri osnovne razrede: zelene (*Chlorophyta*), rjave (*Phaeophyta*) in rdeče alge (*Rhodophyta*). Številne raziskave so potekle na algah kot bogatem viru bioaktivnih učinkovin (Andrade in sod., 2013; El Gamal, 2010). Vendar vprašanje ostaja, kateri od razredov je najbolj obetaven za raziskavo polifenolov. Vsi razredi predstavljajo bogato zalogo terpenoidov, saj so bili iz vseh izolirane številne učinkovine, ki sodijo med diterpene, triterpene in seskviterpene. Ravno tako so vse tri skupine enakovredna zalog bioaktivnih aminokislin. Alge so vir tudi drugih bioaktivnih učinkovin, kot so indoli, acetogenini in hlapni halogenirani ogljikovodiki (Plaza in sod., 2010). Rjave alge so sicer nekoliko manj bogate s steroidi (njihova vsebnost pri rjavih algah dosega 15 %, pri zelenih in rdečih pa 25 - 26 %), pri katerih sta ključna fukosterol (pogosteje zastopan pri zelenih in rjavih algah) in holesterol (pogosteje zastopan pri rdečih algah) (Andrade in sod., 2013; El Gamal, 2010). Izkaže se, da so ravno rjave alge eden bogatih virov terpenoidnih kinonov. Hkrati so ena najbogatejših zalog maščobnih kislin. Med maščobnimi kislinami so najbolj zastopane palmitinska kislina, stearinska kislina in eikozanoidi. Rjave alge so tudi eden najbogatejših zalog fenolnih spojih. Med njimi so najbolj zastopani floroglucinol, bromofenoli in florotanini (polimeri floroglucinola). Rjave alge so torej ena s polifenoli najbolj bogatih skupin organizmov. Ravno florotanini predstavljajo enega njihovih najpomembnejših podrazredov. Dejstvo se sklada z ugotovitvijo, da so ekstrakti iz skupine rjavih alg pokazali največjo antioksidativno aktivnost kot lovilci prostih radikalov (Andrade in sod., 2013). Zaradi domnevnih antidiabetičnih efektov florotaninov in efektov ostalih bioaktivnih komponent, kot so fukoidani, fikokoloidi in pigmenti, predstavljajo rjave alge dragoceno komponento prehrane. Zato je smotrno vzeti rjave alge kot glavno tarčo raziskav. Razred rjavih alg, ki sodi v deblo heterokontofitov, zajema več redov: *Ectocarpales*, *Sphaerariales*, *Tilopteridales*, *Chordiales*, *Desmarestiales*, *Punctariales*, *Dictyosiphonales*, *Laminariales* in *Fucales* (Taylor, 1957). Redovi se razprostirajo čez širok spekter zemljepisnih širin, od tropskega predela do polarnih predelov. Ravno polarni predeli so zaradi zahtevnih abiotiskih in biotskih razmer zanimivi za iskanje rjavih alg, bogatih s polifenoli. Polifenoli

namreč na polarnih področjih delujejo kot obramba proti rastlinojem, ki je zaradi nizke biodiverzitete pogost način prehranjevanja (Amsler in sod., 2010). Povišano sevanje ultravijolične svetlobe lahko povzroči nezanemarljive poškodbe v DNA molekuli. Polifenoli, med njimi florotanini, kot antioksidanti delujejo v smeri odstranjevanja poškodb DNA. Zato so polarne bentične alge primerni organizmi za raziskave polifenolov (Karsten in sod., 2010). Med njimi je aktualen rod *Fucus*, znotraj katerega je vrsta *Fucus vesiculosus* najbolj pogosta in adaptirana vrsta rjavih alg (Taylor, 1957).

#### 2.2.5.1 Alga *Fucus vesiculosus*

*Fucus vesiculosus* L. je polarna bentična alga, ki sodi v red heterokontofitov, razred rjavih alg (*Phaeophyceae*), družino *Fucaceae* in rod *Fucus* (Taylor, 1957). Opisal jo je Carl Linne leta 1753. Gre za 3 - 9 dm visoke rastline, ki se dihotomno, nekoliko nepravilno razvajajo. Steljke so ploščate, trakaste oblike, široke 10 -15 mm. Imajo poudarjeno srednjo žilo (angl. *midrib*) z zračnima vezikloma običajno v paru na vsaki strani srednje žile ali trije na področju razvejanja, na koncih pa so ogolele (Slika 3) (Taylor, 1957). Vezikli so napolnjeni s kisikom, dušikom in ogljikovim dioksidom in regulirajo lebdenje vej. Permeabilni so za plinsko fazo, ne pa za vodo (Barsanti in Gualtieri, 2006).



Slika 3: *Fucus vesiculosus* (FSC, 2013)

Razširjena je predvsem na območjih severnega Atlantskega oceana in se razprostira od obal vzhodne Kanade preko Grenlandije vse do obal Velike Britanije in Irske. Značilna je tudi za obale Baltskega in Severnega morja (Danska, Norveška, Švedska, Finska, Poljska, Estonija, Litva in Latvija) (Taylor, 1957; Wulff in sod., 2010; Rindi in sod., 2004; Korpinen in Jormalainen., 2008). Razmnožuje se spolno z enojno vegetativno fazo (Barsanti in Gualtieri, 2006). V arhegonijih sporofita se z redukcijsko delitvijo tvorijo moške haploidne spolne celice, v oogoniju pa ženske haploidne spolne celice. Moške in ženske spolne celice ob združenju tvorijo zigoto, ki zraste v mlad diploiden sporofit (Barsanti in Gualtieri, 2006). Florotanini so ena ključnih bioaktivnih učinkovin v *Fucus vesiculosus*. Izločanje florotaninov oz. polifenolov namreč igra ključno vlogo pri razmnoževanju alge. Časovno in lokalno se

namreč sklada s pritrjevanjem zigote na podlago. Tik pred vzklitjem zigote izločajo sluz odgovorno za pritrjevanje na podlago, kamor se lokalizira tudi izločanje polifenolov. Ob vzklitju se izločanje omeji na rizoidne konice (Vreeland in sod., 1998). Identificiranih je bilo več florotaninov v *F. vesiculosus* (Parys in sod., 2010). Večina sodi v skupino fukofloretolov. Kot glavne predstavnike lahko navedemo tetrafukol A, fukodifloretol A, fucotrifloretol, trifukodifloretol A in trifukotrifloretol A, ki se razlikujejo glede na število floroglucinolnih enot (Parys in sod., 2010). Akumulacija reaktivnih kisikovih zvrsti sproži diferenciacijo celic v kancerogene celice. Fukofloretoli kot lovilci reaktivnih kisikovih zvrsti združujejo antioksidativne z antikancerogenimi lastnostmi (Parys in sod., 2010). Poleg fukofloretolov so pomembni metaboliti alge tudi t.i. fukoidani. To so sulfatirani polisaharidi, glikozaminoglikani, ki vsebujejo hemi-esterske sulfatne vezi med monosaharidnimi ostanki (Veena in sod., 2007). Fukoidani so s farmakološkega vidika dragocene molekule saj so bili dokazani njihovi antikoagulativni, antititumorski, antimutageni, imunomodulatorni, hipoglikemični, protivirusni, hipolipidemični in protivnetni učinki (Veena in sod., 2007). Algo zaznamujejo tudi druge bioaktivne učinkovine, kot so tetraterpeni, fitosteroli in jod (Rodríguez in sod., 2013). Poleg farmacevtske vrednosti, je uporabna tudi v kozmetični industriji in kot gnojilo, saj ima primerno razmerje dušika, fosforja in kalija (Barsanti in Gualtieri, 2006). Celična stena alge, kot pripadnice rjavih alg, je setavljena iz alginata, polimera glukuronske in manuronske kisline. Zato se ceni tudi kot producent alginata v tekstilni industriji, farmacevtski industriji, kirurgiji (za tretiranje opeklin) in industriji črnila (Barsanti in Gualtieri, 2006). Številna področja aplikacij jo tretirajo kot dragocen organizem v smislu raziskav in proizvodnje.

### 2.2.6 Raziskave polifenolov

Iskanje novih bioaktivnih učinkovin kot novih potencialnih farmacevtikov je stalinca medicinske stroke. Vse večji pomen pa dobivajo trije elementi pridobivanja; vir farmacevtske učinkovine, ekonomičnost procesa pridobivanja in trajnost procesa pridobivanja. Naravni viri bioaktivnih učinkovin, kot so zelišča, sadje, zelenjava in glice, ki jih ljudje lahko vključijo v vsakdanjo prehrano predstavljajo dobro rešitev sodobnega problema, saj jih ljudje lahko vključijo v vsakdanjo prehrano. Njihov sistem izolacije ne predstavlja finančne obremenitve, niti na nobeni ravni ne predstavlja nevarnosti za okolje. Zato tako v prehrani, kot v zdravstvu vse bolj prihajajo v ospredje. Raziskave v veji medicine so usmerjene v proučevanje antikancerogenih, anti-inflamatornih, imunomodulatornih, antioksidativnih, hepatoprotективnih in antimikrobnih učinkov ekstraktov in določanju komponent, ki so za vplive odgovorne. Kot bioaktivna učinkovina z najširšim spektrom učinkov, ki izboljšajo stanje celice, so polifenoli postali center raziskav.

Veliko raziskav je bilo namenjenih kemijskim in fizikalnim lastnostim polifenolov. Izследki o njihovi kemijski strukturi in principu sinteze so že dlje časa znani (Dewick, 2002). Raziskave fizikalnih lastnosti pa so bile usmerjene predvsem v določanje adsorpcijskih izoterm, termodinamskih in kinetičnih lastnosti s polifenoli bogatih ekstraktov v povezavi z industrijskimi aplikacijami. Ena od tipičnih aplikacij je strojenje v usnjarski industriji. V procesu se stabilizira struktura kolagena v živalski koži (Marsal in sod., 2012). Drugi primer

industrijske aplikacije je v industriji sokov (Gao in sod., 2013). Polifenoli so glavni "krivci" za rjavenje sokov, neprijeten fenomen, ki ga industrija želi minimizirati. Hkrati se lahko izolirani polifenoli uporabijo v drugih aplikacijah. Zato je dobrodošlo pridobivanje podatkov o ravnotežnih termodinamskih parametrih, kot so adsorpcijska entalpija, adsorpcijska prosta energija in kinetika adsorpije za oblikovanje ustreznih funkcijskih modelov. Gao in sod. (2013) so oblikovali primere funkcijskih modelov obnašanja polifenolov ob adsorpciji (Gao in sod., 2013).

Ker se polifenoli smatrajo kot pomembne sestavine v prehrani, je bilo veliko študij namenjenih določanju vsebnosti in profila polifenolov v različnih ekstraktih (sadje, zelenjava, gobe in prehranska dopolnila) (Saarinen in sod., 2005; Balasundram in sod., 2006; Djeridane in sod., 2006; Katalinic in sod., 2006; Proestos in sod., 2006; D'Archivio in sod., 2007; Kitzberger in sod., 2007; Luther in sod., 2007; Othman in sod., 2007; Turkoglu in sod., 2007; Ayaz in sod., 2008; Estevinho in sod., 2008; Kubola in sod., 2008; Kukić in sod., 2008; Ksouri in sod., 2009; Quideau, 2009; Soares in sod., 2009; Park in Jhon, 2010; Albert in sod., 2011; Hayes in sod., 2011; Hossain in Rahman, 2011; Kaisoon in sod., 2011; Kilani-Jaziri in sod., 2011; Medina in sod., 2011; Delgado-Adámez in sod., 2012; Dziri in sod., 2012; Edziri in sod., 2012; Kunyanga in sod., 2012; Nithiyanantham in sod., 2012; Salgado in sod., 2012; Fazio in sod., 2013; Fracassetti in sod., 2013; Kim in sod., 2013; Koolen in sod., 2013; Oh in sod., 2013; Roby in sod., 2013; Taviano in sod., 2013). Raziskane so bile gobe, kot je šitake, različno sadje (grodzje, slive, jabolko, jagoda, ribeza, slive, borovnice), tropsko sadje (mango, kokos, ananas), drevesa (bambus in akacija) in zelišča (kamilica in čajna zelišča) (Priloga A). Prva faza raziskav je zajemala pripravo ekstrakta. Glede na glavno topilo so se v raziskavah razvrstili vodni, etanolni, etilacetatni, butanolni in kloroformni ekstrakti. Priprava ekstrakta je zajemala vzorčenje specifičnega rastlinskega dela (listi, steblo, korenine, plod). Sledilo je sušenje materiala in mletje materiala v prah ali pasto. Nato so material suspendirali v ustreznem topilu (metanol, etanol, butanol, kloroform, voda ali etil acetat). Ekstrakt so shranili v temi pri -80 °C. Ekstraktom se je nato določala celokupna vsebnost polifenolov. Zato se enotno uporablja kolorimetrična metoda Folin-Ciocalteau (Folin-Denis) (Lowry in Rosenbrough, 1951). Pri metodi se uporablja Folinov reagent, ki zajema natrijev tungstat hidrat, molibdofosforno in fosforo kislino. Variiral je predvsem sistem inkubacij in valovna dolžina merjenja absorbance (725-765 nm). Sistem kolorimetrične detekcije se umeri glede na standard. Najpogosteje se uporablja galna kislina, aktualni pa so bili tudi katehin in kavna kislina. Nekatere raziskave so nato določanje vsebnosti polifenolov razparcelirale na določanje vsebnosti posameznih skupin polifenolov; flavonoidov (Djeridane in sod., 2006; Dziri in sod., 2012). Po določanju celokupne koncentracije polifenolov je veliko raziskav določilo tudi profil polifenolov. Običajni metodi sta bili HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija) in MS (masna spektrometrija) in njune različice.

Po določanju profila polifenolov so sledili eksperimenti raziskave vplivov polifenolov. Večina raziskav se je osredotočila na antioksidativne učinke polifenolov. Raziskave so potekale predvsem na *in vitro* sistemih (Saarinen in sod., 2005; Balasundram in sod., 2006; Djeridane in sod., 2006; Katalinic in sod., 2006; Proestos in sod., 2006; D'Archivio in sod., 2007; Kitzberger in sod., 2007; Luther in sod., 2007; Othman in sod., 2007; Turkoglu in sod., 2007;

Ayaz in sod., 2008; Estevinho in sod., 2008; Kubola in sod., 2008; Kukić in sod., 2008; Ksouri in sod., 2009; Quideau, 2009; Soares in sod., 2009; Park in Jhon, 2010; Albert in sod., 2011; Hayes in sod., 2011; Hossain in Rahman, 2011; Kaisoon in sod., 2011; Kilani-Jaziri in sod., 2011; Medina in sod., 2011; Delgado-Adámez in sod., 2012; Dziri in sod., 2012; Edziri in sod., 2012; Kunyanga in sod., 2012; Nithiyanantham in sod., 2012; Salgado in sod., 2012; Fazio in sod., 2013; Fracassetti in sod., 2013; Kim in sod., 2013; Koolen in sod., 2013; Oh in sod., 2013; Roby in sod., 2013; Taviano in sod., 2013). Klasični sestavljeni *in vitro* sistemi so metoda DPPH (analiza sposobnosti lovljenja prostih radikalov), metoda FRAP (antioksidativna moč redukcije železa), analiza sposobnosti redukcije in indirektna spektrofotometrična metoda ABTS. Omenjene metode imajo skupen princip. Antioksidanti v preiskovanem vzorcu reducirajo oksidirano obliko molekule, ki je lahko radikal ali ion (Dziri in sod., 2012; Kim in sod., 2013; Benzie in Strain, 1996; Jayanthi in Lalitha, 2011). Pri metodi DPPH je to 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, pri metodi ABTS 2,2'-azino-bis(3-etylbenztiazolin-6-sulfonska kislina), pri metodi FRAP  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ (železov tripiridil tirazin) in pri analizi redukcijske moči kalijev fericianid. Reducirane oblike premaknjen absorpcijski vrh glede na oksidirane oblike. Zato se pri metodah izmeri absorbanca reducirane oblike reagenta, ki je proporcionalna njegovi koncentraciji in s tem celokupni koncentraciji polifenolov v preiskovanem vzorcu (Dziri in sod., 2012; Kim in sod., 2013; Benzie in Strain, 1996; Jayanthi in Lalitha, 2011).

Manj raziskav antioksidativnega delovanja pa se odvija na celicah (Halliwell, 2008; Stagos in sod., 2012). Načeloma so *in vivo* sistemi (celične kulture) bistveno bolj realni sistemi za proučevanje vplivov polifenolov. V celici namreč reaktivne kisikove zvrsti vstopajo v reakcije s celičnimi podsistemi (jedro, mitohondriji) in endogenimi antioksidanti v vsakem od teh podsistemov. Molekule, ki delujejo kot antioksidanti, lahko delujejo kot lovilci radikalov, vplivajo na encime, ki so odgovorni za njihovo odstranjevanje ali vplivajo na njihove pripadajoče transkripcijske faktorje. Nasprotno pa pri *in vitro* testih določamo aktivnost zgolj tistih antioksidantov, ki lovijo proste radikale. *In vivo* študije so bodisi zajemale gojenje rakastih sesalskih celičnih linij, kot so A549, HCT15 in MCF7 na DMEM mediju z v flaškah, bodisi injiciranje ekstrakta v podkožje živalskega modela- miši (Mhadhebi in sod., 2011). Na celičnih linijah so se odvijale predvsem študije anti-proliferativnega učinka. Primer testa je MTT test viabilnosti. Test temelji na pretvorbi MTT (3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil tetrazolijev bromid) v formazan z dehidrogenazami v mitohondrijih. Koncentracija nastalega formazana se izmeri spektrofotometrično. Test MTT izvedemo na vzorcih celične kulture, ki so bile izpostavljene različnim dejavnikom ali ekstraktom (Mhadhebi in sod., 2011). Študije antikancerogenih učinkov so proučevali s adhezijo tumorskih celic, tretiranih s polifenoli, na film krvnih ploščic. Na živalskih modelih so potekale študije anti-inflamatornih in antikoagulativnih učinkov polifenolov. Anti-inflamatorni učinki so bili izvedeni na mišjih modelih z vnetjem peritonealne votline. Po intraperitonealni aplikaciji ekstraktov in pridobivanju peritonealne tekočine je bilo prešteto število levkocitov. Anti-koagulativne lastnosti so proučevali z merjenjem časa strjevanja krvi (Cumashi in sod., 2007). V *in vivo* sistemih (celičnih kulturah) so bile raziskave antimikrobnih, kemopreventivnih oz. antikancerogenih in antidiabetičnih učinkov polifenolov pogostejše kot raziskave antioksidativnih učinkov (Stagos in sod., 2012; Vadivel in Biesalski, 2011).

Zanimivo je, da so redke študije, ki bi sistemsko preverile vpliv ekstraktov, bogatih s polifenoli na *in vivo* modelu. Težko je zaslediti študije, ki bi preverile vpliv ekstraktov, bogatih s polifenoli na transkriptomskem, proteomskem in metabolomskem nivoju organizma, ki bi globalno proučila organizem pred in po tretiranju. Zelo malo je raziskav, ki bi proučevale mehanizem interakcij polifenolov z dugimi molekulami (Sivam in sod., 2012). Primer je raziskava Sivam in sod. (2012), v kateri so v procesu peke kruha dodali ekstrakt črnega ribeza, iz vzorcev kruha ekstrahirali polifenole in jih analizirali z FT-IR (infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo). Proučili so interakcije polifenolov s pektini in ostalimi pšeničnimi polisaharidi (Sivam in sod., 2010). Ni zaslediti raziskav, ki bi upoštevale vpliv morebitnih modifikacij polifenolov pri prehodu skozi prebavni trakt na njihovo aktivnost. Celice posameznika namreč vedno pridobijo snovi, ki so obše sistem prebavnega trakta; molekule postanejo biodostopne za celico. V tem delu nastopi glavno izhodišče magistrske naloge. Zato smo se odločili na *in vivo* modelu kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* s sistemskim proteomskim pristopom primerjati vpliv s polifenoli bogatega ekstrakta *F. vesiculosus* pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta. Z 2-D elektroforezo smo določili diferencialno izražene proteine in jih identificirali. Osredotočili smo se na mitohondrijsko frakcijo proteinov in se usmerili na njihove medsebojne povezave v metabolni poti. Z vključevanjem morebitnih sinergističnih učinkov polifenolov z ostalimi bioaktivnimi učinkovinami v ekstraktu smo izluščili celokupen učinek polifenolov na metabolni profil in stanje celic. *S. cerevisiae* je eden najprimernejših evkariontskih modelov za sistemskе raziskave.

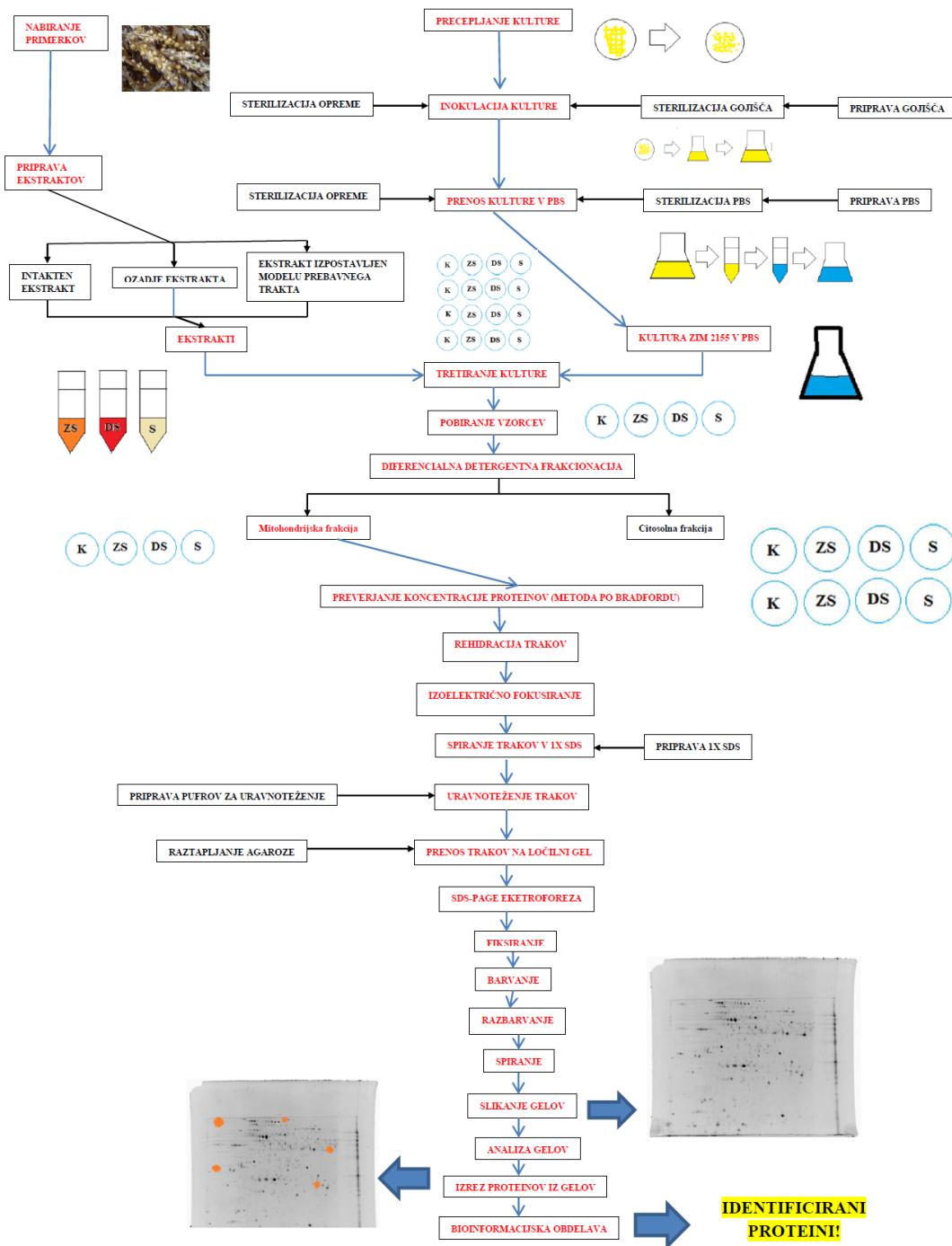
### 2.3 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae*

Pri vsakem tipu sistemске raziskave so najprimernejši tarčni organizmi raziskav tisti, ki so enostavni v smislu tehničnega rokovanja, hkrati pa dovolj reprezentativni, da se pridobljene informacije lahko ekstrapolirajo na organizem, na katerega se bodo izsledki raziskav nanašali; na človeka. V eksperimentalnem delu magistrske naloge se potencialno lahko uporabita dve celični kulturi: kultura kvasovk in kultura sesalskih celičnih linij. Glavno vprašanje je, kateri od obeh sistemov je primernejši model za izvedbo sistemске študije. Sistem obnašanja sesalskih celic na genomske, transkriptomski in proteomske ravni, kot je sistem posttranslacijskih modifikacij, je identičen človeškim celicam. Sesalska celična linija ima tudi identičen princip rasti, kot človeške celice. O-glikozilacijske vezi so glikozilirane s sialno kislino (Demain in Veishnav, 2009). Proteini bodo z uporabo sesalske celične linije identično zviti, kot v človeških celicah, zato je enostavno potegniti vzporednice med sistemskim vplivom določenega biotskega ali abiotskega dejavnika na linijo in na človeško celico. *S. cerevisiae* ima drugačen profil glikozilacije v primerjavi s sesalskimi celičnimi linijami. O-glikozidne vezi so namreč hipermanozilirane. Zato lahko težje predvidimo primerljivost zvitja proteinov med človeško celico in kvasovko. Zvitje proteinov pa je glavna odvisna spremenljivka v proučevanju funkcionalnih in nefunkcionalnih interakcij med izbranim dejavnikom (toksin, bakteriostatik, ekstrakt, idr.) in proteinom kvasovke. S spremenjenim sistemom zvitja se namreč lahko spremeni mehanizem interakcije. Po drugi strani pa ima *S. cerevisiae* številne tehnične prednosti pred sesalskimi celičnimi linijami. Je evkariontski organizem s kratkim generacijskim časom (bistveno krajšim v primerjavi s sesalsko celico) oz.

hitrim življenjskim ciklom. Gojišča za njihovo gojenje so dobro definirana in imajo izrazito nižjo ceno v primerjavi s sesalskimi celicami. *S. cerevisiae* je stabilen in robusten organizem z relativno širokim optimumom pH, temperature, kisika in redukcijskega potenciala, kar poudari njegovo enostavnost za uporabo. V gojišču, bogatem z glukozo, raste v visoki celični gostoti. Gojišče je lahko tekoče, v katerem rastejo kot dispergirane celice, ali trdno, v katerem rastejo kot kolonije (Guthrie in Fink, 1991). Gre za najenostavnejši evkariontski sistem, ki ga obravnavamo kot modelni organizem, tudi s stališča genetske manipulacije, saj so sistemi in orodja za transformacijo razvita, hkrati je že dolgo znana sekvenca genoma (Demain in Veishnav, 2009). V sosledju s tehničnimi prednostmi kvasovke pred sesalskimi celicami, je kvasovka dovolj reprezentativen organizem za študijo vpliva ekstrakta na človeka. Med človeškimi celicami in kvasovkami je namreč veliko ključnih življenjskih ciklov ohranjenih. V mediju, bogatim s kisikom se razmnožujejo, dokler se vir ogljika ne izkoristi. Po izkoriščanju vira ogljika nastopi t.i stacionarna faza (Gray in sod., 2004). Stacionarna faza je pri kvasovkah primerljiva s fazo G<sub>0</sub> evkariontskih celic. Zato večino procesov, ki jih ekstrapoliramo na višje evkarionte pri kvasovkah proučujemo v stacionarnem stanju. Kvasovke imajo z višjimi evkarionti primerljiv celični cikel in identične osnovne celične procese zaradi visokega deleža homolognih proteinov (Ma, 2001). Zaradi visokega deleža homolognih proteinov kvasovke z višjimi evkarionti povezujejo še podobne metabolne poti in stresni odgovori, v katerega sta vključena tudi antioksidativni obrambni sistem in popravljalni mehanizmi. Zato je kvasovka dober model za proučevanje odgovora organizma na spremembe v okolju (Zakrajšek in sod., 2011; Cigut in sod., 2011). Hkrati je dober model za proučevanje vplivov specifične bioaktivne komponente na omenjen obrambni sistem in na splošno energetsko stanje celice (večina energije namreč tako pri sesalskih celicah, kot pri *S. cerevisiae* prihaja od mitohondrijske respiracije), stanje celičnega proteoma in metaboloma (Zakrajšek in sod., 2011; Cigut in sod., 2011).

### 3 MATERIALI IN METODE

Slika 4 prikazuje shemo celotnega poteka dela magistrske naloge.



Slika 4: Shema celotnega poteka dela magistrske naloge

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Kultura

Uporabili smo kulturo *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil (ZIM). Kulturo smo tri dni inkubirali na petrijevnih ploščah pri 28 °C.

#### 3.1.2 Precepljanje kulture

##### 3.1.2.1 Kemikalije

- YEPD trdno:
  - pepton bakteriološki agar (20 g/L) G32 (Sigma)
  - glukoza (20 g/L) E12 (Sigma)
  - kvasni ekstrakt (10 g/L) A24 (Sigma)
  - agar (20 g/L) A22 (Sigma)
  - destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)

##### 3.1.2.2 Aparature in oprema

- plastične eze
- petrijeve plošče
- brezprašna komora LFV 122 (Pio)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- tehtnica (Radwag)

#### 3.1.3 Inokulacija kulture

##### 3.1.3.1 Priprava materiala za inokulacijo

###### 3.1.3.1.1 Kemikalije

- YEPD tekoče:
  - pepton bakteriološki agar (20 g/L) G32 (Sigma)
  - glukoza (20 g/L) E12 (Sigma)
  - kvasni ekstrakt (10 g/L) A24 (Sigma)
  - destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)

###### 3.1.3.1.2 Aparature in oprema

- 1-L čaša
- tehtnica (Radwag)
- 1-L merilni valj
- magnetno mešalo MM 540 (Tehtnica)

- 1-L erlenmajerica SCHOTT DURAN s stransko roko in enim utorom
- 50-mL erlenmajerica BOROSILICAT s stransko roko in enim utorom
- 2x merilni valj ( $V = 50 \text{ mL}$ )
- 500-mL merilni valj
- penasti zamaški
- Avtoklav (Sutjeska)

### 3.1.3.2 Inokulacija

#### 3.1.3.2.1 Aparature in oprema

- brezpršna komora LFV 122 (Pio)
- plastične eze
- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- stresalnik Multitron (Infors HT)

### 3.1.4 Prenos kulture v PBS

#### 3.1.4.1 Priprava materiala za prenos kulture

##### 3.1.4.1.1 Kemikalije

- tabletke PBS (Oxoid)
- bidestilirana voda ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )

##### 3.1.4.1.2 Aparature in oprema

- 500-mL erlenmajerica (Simex)
- 100-mL merilni valj
- penast zamašek
- magnetno mešalo MM 540 (Tehnica)
- 1-L čaša
- 1-L merilna bučka
- 1-L steklenica Scött
- inkubator IG 150 (Jouan)
- stresalnik Multitron (Infors HT)

#### 3.1.4.2 Prenos kulture v PBS

##### 3.1.4.2.1 Kemikalije

- raztopina PBS

### 3.1.4.2.2 Aparature in oprema

- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- 50-mL falkonke
- vrtinčnik TTS (Ika)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- stresalnik Multitron (Infors HT)

## 3.1.5 Priprava ekstrakta

### 3.1.5.1 Kemikalije

- vodni ekstrakt: *F. vesiculosus*

## 3.1.6 Tretiranje kulture

### 3.1.6.1 Aparature in oprema

- 50-mL falkonke
- vrtinčnik TTS (Ika)
- majhni penasti zamaški
- stresalnik Multitron (Infors HT)

## 3.1.7 Pobiranje vzorcev

### 3.1.7.1 Kemikalije

- tabletke PBS (Oxoid)
- bidestilirana voda (ddH<sub>2</sub>O)
- tekoči dušik

### 3.1.7.2 Aparature in oprema

- vrtinčnik TTS (Ika)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)

## 3.1.8 Diferencialna detergentna frakcionacija

### 3.1.8.1 Kemikalije

- komplet "Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit" (Calbiochem)
  - 5x citosolni ekstrakcijski pufer
  - 1x mitohondrijski ekstrakcijski pufer
  - 500x raztopina proteaznega inhibitorja
  - 1 M raztopina DTT

### 3.1.8.2 Aparature in oprema

- vrtinčnik TTS (Ika)
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- 12,5 mL falkonke (TPP)
- 1,5-; 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- 0,5 mm cirkonij-kremenčeve kroglice (BioSpec Products)

## 3.1.9 Preverjanje koncentracije ekstrahiranih proteinov mitohondrijske frakcije (metoda po Bradfordu)

### 3.1.9.1 Kemikalije

- bradfordov reagent (Biorad)
- citosolni ekstrakcijski pufer z inhibitorjem proteaz in ditiotreitolom
- mitohondrijski ekstrakcijski pufer z inhibitorjem proteaz in ditiotreitolom
- bidestilirana voda (ddH<sub>2</sub>O)

### 3.1.9.2 Aparature in oprema

- 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- 96-mestna prozorna mikrotiterska plošča (Nunc)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire 2 (Tecan)

## 3.1.10 Prva dimenzija 2-D elektroforeze

### 3.1.10.1 Rehidracija trakov

#### 3.1.10.1.1 Kemikalije

- pufer za rehidracijo (Preglednica 3)
- ditiotreitol (Sigma)
- mineralno olje (Sigma)

#### 3.1.10.1.2 Aparature in oprema

- trakovi s pH gradientom 4-7 dolžine 13 cm
- podstavek z rezami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- 1,5-mL mikrocentrifugirke
- tehnicka (Sartorius)
- centrifuga (Eppendorf)

### 3.1.10.2 Izoelektrično fokusiranje

#### 3.1.10.2.1 Kemikalije

- destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- mineralno olje (Sigma)

#### 3.1.10.2.2 Aparature in oprema

- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- elektroforetska enota Multiphor II (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare)
- 10-mL merilni valj
- 150-mL merilni valj
- plastična plošča z vdolbinami
- elektrodnji trak (GE Healthcare)
- elektrodi
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

### 3.1.11 Druga dimenzija 2-D elektroforeze

#### 3.1.11.1 Vlivanje gelov

##### 3.1.11.1.1 Kemikalije

- 96 % (v/v) etanol
- TEMED (Sigma)
- Tris-baza (Sigma)
- SDS (Sigma)
- bidestilirana voda (ddH<sub>2</sub>O)
- APS (Sigma)
- raztopina akrilamid/bisakrilamid (30%/0,8%) (Sigma)

##### 3.1.11.1.2 Aparature in oprema

- stekleni plošči
- distančnik debeline 1 mm
- gel za tesnenje
- stojalo za stekleni plošči
- držalo za stekleni plošči
- Schött steklenička
- ultrazvočna kopel (Sonis-Bio)

### 3.1.11.2 Uravnoteženje trakov

#### 3.1.11.2.1 Kemikalije

- DTT (Sigma) (za pripravo 65mM raztopine)
- JAA (Sigma) (za pripravo 260 mM raztopine)
- 5x SDS pufer (Preglednica 6)
- osnovni pufer za uravnoteženje (Preglednica 5)

#### 3.1.11.2.2 Aparature in oprema

- steklene epruvete
- 50-mL flakonka z modrim zamaškom
- plastične epruvete
- stresalna plošča (Biomotors)

### 3.1.11.3 SDS-PAGE elektroforeza

#### 3.1.11.3.1 Kemikalije

- destilirana voda (dH<sub>2</sub>O)
- ročna steklena pipeta
- agarozna (Sigma)
- 5x SDS pufer (Preglednica 6)
- bromofenol modro

#### 3.1.11.3.2 Aparature in oprema

- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- SDS-PAGE posoda (zgornja in spodnja) (GE Healthcare)
- stojalo z elektrodnimi priključki
- mikrovalovna pečica (Sanyo)

## 3.1.12 Barvanje 2-D gelov s SYPRO Ruby barvilom

#### 3.1.12.1 Kemikalije

- 100 % (v/v) metanol (Merck)
- 100 % (v/v) ocetna kislina (Merck)
- barvilo SYPRO Ruby (Invitrogen)
- bidestilirana voda (ddH<sub>2</sub>O)

### 3.1.12.2 Aparature in oprema

- plastične banjice 19,5 x 20,8 cm (Rotho)
- stresalna plošča (Biometra)
- 500-mL merilni valj

### 3.1.13 Slikanje gelov

#### 3.1.13.1 Aparature in oprema

- sistem za dokumentacijo gelov CAM-GX- CHEMI HR- Gbox kamera (Syngene)

### 3.1.14 Analiza gelov in identifikacija diferencialno izraženih proteinov

#### 3.1.14.1 Aparature in oprema

- program za analizo gelov Dymenion (SynGene)

### 3.1.15 Izrez diferencialno izraženih proteinov

#### 3.1.15.1 Aparature in oprema

- UV Transiluminator
- 1,5-mL mikrocentrifugirke

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Precepljanje kulture

Pri precepljanju smo uporabili kulturo *S. cerevisiae* iz Zbirke Industrijskih Mikroorganizmov (ZIM 2155). Kulturo smo precepljali aseptično na trdno YEPD gojišče (kvasni ekstrakt pepton dekstrozno gojišče). Pred vsakim precepljanjem smo preverili sterilnost gojišča in stanje kolonij kulture iz prejšnjega tedna.

### 3.2.2 Inokulacija kulture

Po precepljanju kulture je sledila inokulacija kulture. Inokulirali smo vedno tri dni staro precepljeno kulturo. Celotna inokulacija je bila sestavljena iz dveh sklopov; priprave materiala za inokulacijo in samega postopka inokulacije.

#### 3.2.2.1 Priprava materiala za inokulacijo

Priprava materiala za inkulacijo je vključevala tri sklope; zatehtanje gojišča za inokulacijo, pripravo gojišča in steklovine za sterilizacijo in sterilizacijo gojišča in steklovine.

Pripravili smo 1 L YEPD tekočega gojišča. Za pripravo 1 L tekočega YEPD gojišča smo zatehtali 20 g bakteriološkega agarja (Sigma), 20 g glukoze in 10 g kvasnega ekstrakta.

Zatehtanju gojišča je sledila priprava materiala za sterilizacijo. Sterilizirali smo dve literski erlenmajerici z enim utorom in stransko roko. Ena je bila namenjena vzorcu kulture, druga je služila kot slepi vzorec (vsebovala je zgolj gojišče). V obe smo dolili 360 mL gojišča. Ravno tako smo sterilizirali dve 100-mL erlenmajerici; eno namenjeno vzorcu in eno namenjeno slepemu vzorcu za umerjanje spektrofotometra. V obe smo nalili 50 mL pripravljenega gojišča.

Pripravi materiala za sterilizacijo je sledila sterilizacija materiala z avtoklaviranjem 20 min pri tlaku 1,2 bara in temperaturi 121 °C. Sterilizacija je potekala v avtoklavu v skladu z navedenimi navodili za uporabo.

Pripravi materiala za inokulacijo je sledila inokulacija kulture.

### 3.2.2.2 Inokulacija kulture

Uporabili smo tri dni staro precepljeno kulturo *S. cerevisiae* ZIM 2155. Delo je potekalo aseptično (ob gorilniku v brezprašni komori). Kulturo smo postopoma nacepljali v 50 mL tekočega YEPD gojišča. Po vsakem nacepljanju v tekoče gojišče smo izmerili optično gostoto (OD) kulture pri 650 nm. Nacepljanje v 100-mL erlenmajerice smo ponavljali, dokler optična gostota (OD) ni dosegla vrednosti 0,95. Dovolili smo razpon 0,94-0,96. Po nacepljanju smo 40 mL kulture prenesli v erlenmajerico s 360 mL tekočega YEPD gojišča in ponovno izmerili OD pri 650 nm. Sledila je kultivacija 60 h pri 200 obratih/min in 28 °C.

### 3.2.3 Prenos kulture v PBS

Po 60-urni kultivaciji je sledil prenos kulture v PBS. V 400 mL gojišča smo pričakovali namnožitev celic do celične gostote  $5 \times 10^8$  celic/mL. Tako kot inokulacija je bil tudi prenos kulture v PBS pufer sestavljen iz dveh sklopov; priprave materiala za prenos kulture in prenosa kulture v PBS.

#### 3.2.3.1 Priprava materiala za prenos kulture

Priprava materiala za prenos kulture v PBS je vključevala tri sklope; pripravo PBS pufra za prestavitev kulture, pripravo materiala za sterilizacijo in sterilizacija materiala.

Za prenos kulture smo potrebovali sterilen PBS pufer, segret na 28 °C. Za pripravo 1L pufra PBS smo raztopili 10 tabletk (1 tabletka na 100 mL ddH<sub>2</sub>O). Sledilo je avtoklaviranje PBS 20 min pri tlaku 1,2 bar in temperaturi 121 °C. Sterilen PBS smo nato namestili v inkubator s temperaturo 28 °C.

### 3.2.3.2 Prenos kulture v PBS

Pred prenosom kulture v PBS smo preverili namožitev naše kulture z merjenjem OD pri 650 nm. Absorbanca naše vzorčne kulture je morala zavzeti vrednost okrog dve, kar predstavlja  $5 \times 10^8$  celic/mL gojišča. Sledil je prenos 50 mL brozge v falkonke. Postopek je potekal aseptično (v brezprašni komori ob gorilniku). Sledilo je centrifugiranje pri 4000 obratih/min, 3 minute. Supernatant smo odlili. Nato smo celice resuspendirali z vrtinčenjem v 50 mL PBS pufra, ogretega na 28 °C. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri 4000 obratih/min, 3 min, odlivanje supernatanta in resuspendiranje v 50 mL PBS. 40 mL suspenzije smo nato prenesli v 500 mL erlenmajerico Simex (1 utor) in dodali 160 mL PBS. Število celic se je s tem razredčilo na  $10^8$  celic/mL. Sledila je 60-urna inkubacija pri 220 obr/min in 28 °C. Med kultivacijo in inokulacijo mora vedno biti ohranjeno enako razmerje zaradi potrebe po ohranitvi enakih pogojev, kot je volumetrični koeficient snovne prestopnosti kisika.

### 3.2.4 Priprava ekstraktov

V magistrski nalogi smo primerjali vpliv s polifenoli bogatega ekstrakta *Fucus vesiculosus* pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta. Ekstrakti so bili pridobljeni v okviru projekta SAFEFOODERA: "Safe transportation of marine bioactive's from source to active site" - Varen prenos morskih bioaktivnih snovi od vira do mesta delovanja. Zanimala nas je namreč razlika v vplivu intaktnega, s polifenoli bogatega ekstrakta in ekstrakta, ki bi ga človek prebavil ob prehranjevanju. Zato je priprava ekstrakta zajemala tri sklope; nabiranje primerkov, priprava intaktnega ekstrakta in izpostavitev ekstrakta modelu prebavnega trakta TNO (TIM-1)

#### 3.2.4.1 Nabiranje primerkov *Fucus vesiculosus*

Vzorci alge so bili pobrani decembra 2008 na jugozahodni Islandiji; obalni regiji Hvassahrauna blizu mesta Hafnarfjordur. Najprej so bili sprani z morsko vodo, da so bili odstranjeni pesek in epifiti. Sledilo je spiranje pod tekočo vodo in prenos v laboratorij, kjer so bili razrezani, zamrznjeni in zmleti v fin prah. Vzorci so se nato zapakirali v polistirenski embalaži in shranili v hladilniku pri -20 °C pred ekstrakcijo.

#### 3.2.4.2 Priprava ekstrakta

V okviru projekta nam je bil posredovan vodni ekstrakt *F. vesiculosus*. Pridobljen je bil tako, da so 10 g ekstrakta suspendirali v 100 mL destilirane vode (dH<sub>2</sub>O). Sledilo je stresanje 24 h pri 200 obratih/min pri sobni temperaturi. Mešanica je bila nato centrifugirana pri 3500 obratih/min, 10 min. Supernatant je bil nato prefiltriran skozi filter papir. Filtrat se je zamrznil in hrnil pri -80 °C.

Na ekstraktih so bili izvedeni testi vsebnosti polifenolov, kot je metoda Folin-Ciocalteau za določanje celokupnih polifenolov, metoda DPPH (analiza sposobnosti lovljenja prostih radikalov), analiza sposobnosti redukcije in metoda FRAP (antioksidativna moč redukcije železa).

### 3.2.4.3 Izpostavitev ekstrakta TNO-modelu prebavnega trakta (TIM-1) (angl. *TNO- in vitro gastrointestinal model*)

Vodni ekstrakt *F. vesiculosus* je bil TNO modelu prebavnega trakta izpostavljen v okviru projekta SAFEFOODERA: "Safe transportation of marine bioactive's from source to active site" - Varen prenos morskih bioaktivnih snovi od vira do mesta delovanja. TNO model prebavnega trakta je oddelčno zgrajen, računalniško voden sistem, ki simulira pogoje v človeškem prebavnem traktu. Zgrajen je iz dveh delov; TIM-1 in TIM-2.

Sistem TIM-1 simulira model želodca in tankega črevesja (Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO, 2013). V omenjenem segmentu je kontroliran gastrični pH, temperatura, pretok slino, pretok želodčnega soka s kompleksom želodčnih prebavnih encimov, pretok soka trebušne slinavke s kompleksom prebavnih encimov trebušne slinavke in pretok žolča. Kontrolirano je tudi odstranjevanje lipofilnih in hidrofilnih komponent s pomočjo sistema votlih cevk. Sistem je zgrajen iz dveh segmentov; Prvi segment zajema želodec, drugi segment zajema tanko črevo. V segmentu želodca se ekstrakt zmeša s kombinacijo želodčne kislina (HCl), lipaze in pepsina. Želodčna kislina, lipaza in pepsin se v odsek želodca prečrpajo iz ločenih posod. V prostoru, ki simulira želodec se ekstrakt pomika med levim in desnim koncem, kar simulira dejansko stanje v človeškem želodcu. V sistemu je priključena pH elektroda in termometer za merjenje temperature. Senzorja, ki sta povezana z računalnikom, beležita meritve. Ekstrakt, izpostavljen želodčnim sokom, se nato premakne v drugi segment; segment tankega črevesja. Segment je razdeljen na tri dele; dvanajstnik (duodenum), zgornje tanko črevo (jejunum) in spodnje tanko črevo oz. vito črevo (ileum). V dvanajstniku se najprej nevtralizira pH z dodatkom natrijevega bikarbonata. Sledi emulzifikacija maščob z dodatkom žolča in razgradnja maščob z dodatkom encimov trebušne slinavke. S pomočjo peristaltičnega sistema se ekstrakt pomika proti koncu prebavnega trakta. Sistem vključuje računalniški nadzor z merjenjem pH in temperature. Na koncu tankega črevesja se nahaja sistem votlih cevk, ki absorbirajo (odstranjujejo) razgrajene (biodostopne) nutrente. Nerazgrajene (neprejavljene) komponente se premaknejo v sistem TIM-2 (Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO, 2013). Sistem TIM-2 simulira model tankega črevesja (Bell in Ferrari, 2009). Vzorce lahko pobiramo v vseh fazah med prehodom ekstrakta skozi model prebavnega trakta. Vzorci naših ekstraktov so bili pobrani pred in po prehodu skozi model TIM-1.

### 3.2.5 Tretiranje kulture

Preglednica prikazuje ekstrakte, s katerimi je bila tretirana celična suspenzija kvasovke. Navedene so tudi začetne koncentracije ekstrakta, končna koncentracija in volumni vzorcev, ki smo jih odpipetirali v celično suspenzijo.

Preglednica 2: Ekstrakti, uporabljenimi pri tretiranju z njihovimi oznakami, začetnimi koncentracijami, končnimi koncentracijami glede in odpipetiran volumen ekstrakta glede na volumen celične suspenzije

Ekstrakt	Oznaka	Angleška oznaka	Začetna koncentracija (mg/mL)	Končna koncentracija v suspenziji (mg/mL)	Volumen suspenzije (mL)	Volumen dodanega ekstrakta (µL)
Ekstrakt pred prehodom skozi model prebavnega trakta (TIM-1)	ZS	zero sample	8,21	0,35	10	425
Ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta (TIM-1)	DS	digested sample	4,60	0,35	10	760
Ozadje ekstrakta	S	blank sample	/	/	10	760
Kontrolni vzorec (PBS)	K	control sample	/	/	10	760

Vsa tretiranja so bila izvedena v treh bioloških ponovitvah. Prva faza je zajemala odtaljevanje ekstraktov. Ekstrakte smo predhodno dali za 5 min v inkubator, nato približno 30 min odtajali na sobni temperaturi. Delo je potekalo aseptično ob gorilniku. V vse falkonke smo odpipetirali naveden volumen celične suspenzije. Po štiri falkonke s celično suspenzijo smo nato namenili vsakemu od tretiranj. Odpipetirali smo navedene volumne ekstraktov (Preglednica 2). Po dodatku vsakega od ekstraktov je sledila inkubacija 2h na stresalniku pri 220 obratih/min in 28 °C.

### 3.2.6 Pobiranje vzorcev

V prvi fazi smo združili po dve od štirih falkonk vsakega tretiranja (vzorčili smo 2 x 20 mL suspenzije za ponovno tretiranje). Sledilo je centrifugiranje pri 4000 obratih/min, 3 min. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in pelet resuspendirali v 20 mL PBS pufra. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri 4000 obratih/min, 3 min in odlite supernatanta. Vzorce smo nato zamrznili v tekočem dušiku pri -196 °C in shranili v skrinjo na -80 °C.

### 3.2.7 Diferencialna detergentna frakcionacija

Diferencialna detergentna frakcionacija je sestavljena iz dveh ključnih faz: faza razbijanja celic z detergentnim pufrom in faza frakcionacije. V fazi razbijanja celic z detergentnim pufrom pridobimo vsebino celic. V fazi frakcionacije ločimo frakcije proteinov, ki pripadajo različnim celičnim organelom. Običajno ločimo citosolno frakcijo od mitohondrijske frakcije.

Prva faza diferencialne detergentne frakcionacije (razbijanje celic) je zajemala tretiranje na ledu odtaljenih celic s citosolnim ekstrakcijskim pufrom v kombinaciji s cirkonij-kremenčevimi kroglicami. Ekstrakcijski pufer spremeni površinsko napetost in permeabilnost membrane. Kremenčeve kroglice vzpostavijo dovolj velike strižne sile za poškodbo celične membrane. Kroglice skupaj s pufrom omogočajo učinkovito izločanje vsebine celic. Ob izločanju celične vsebine lahko intaktnost proteinov ogrožata dva dogodka; prvi je njihova oksidacija, drugi pa je razgradnja s proteazami. Zato smo morali v pufer dodati DTT (ditiotreitol), ki ohrani protein v reducirarem stanju in inhibitor proteaz, ki prepreči delovanje proteaz v smislu razgradnje proteinov. Na rapolago smo imeli 5x citosolni ekstrakcijski pufer, potrebovali pa smo 1x citosolni ekstrakcijski pufer. Pripravili smo dva ločena razredčena pufra. V enega smo dodali DTT (1 $\mu$ L/mL pufra) in inhibitor proteaz (2 $\mu$ L/mL pufra), v drugega sestavini nismo dodali. Po pripravi pufra smo k vzorcem odtaljenega peleta tretirane kulture odpipetirali po 1, 25 mL citosolnega ekstrakcijskega pufra in resuspendirali z vorteksiranjem. Vsak vzorec smo nato prenesli v 12,5-mL falkonke in dodali po pet žličk cirkonij-kremenčevih kroglic. Vsak vzorec smo nato petkrat po 1 min homogenizirali na vrtinčniku pri maksimalni hitrosti, med vsako homogenizacijo je sledila 1 min inkubacije na ledu.

Po detergentni frakcionaciji je sledila faza diferencialnega centrifugiranja. Homogenizirane vzorce smo centrifugirali v 20 min pri 800 g in temperaturi 4 °C. Namen je bil predvsem ločiti celokupno vsebino celic od cirkonij-kremenčevih kroglic in celičnega debrisa. Pričakovali smo, da so mitohondriji v omenjeni fazi ostali celi in da se je celični debris posedel. V naslednjem delu smo prenesli 1 mL supernatanta v 2-mL mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 min pri 800 g in 4 °C. V omenjeni fazi smo pričakovali citosol z intaktnimi mitohondriji še vedno v supernatantu, v peletu pa ostanke plazmaleme, jedra in vakuole. Zato smo 900  $\mu$ L supernatanta prenesli v svežo 1,5-mL mikrocentrifugirko in centrifugirali pri 10 000 g in 4 °C, 30 min. Mitohondrije smo sedaj pričakovali v peletu. 600  $\mu$ L supernatanta, ki je predstavljal citosolno frakcijo smo odpipetirali v nove 2-mL mikrocentrifugirke in centrifugirali 20 min pri 20 000 g in 4 °C. Supernatant pa je predstavljal očiščeno citosolno frakcijo. Pelet, ki je predstavljal mitohondrijsko frakcijo v 1,5-mL mikrocentrifugirkah, smo resuspendirali v 1 mL citosolnega ekstrakcijskega pufra brez DTT in inhibitorja proteaz. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 10 000 g in temperaturi 4 °C. Postopek spiranja smo še enkrat ponovili. Po zadnjem spiranju smo mitohondrijski pelet raztopili v 50  $\mu$ L mitohondrijskega ekstrakcijskega pufra z inhibitorjem proteaz (1 $\mu$ L/mL pufra) in DTT (2 $\mu$ L/mL pufra) z vorteksiranjem. Pufer smo predhodno pripravili. Pri mitohondrijski frakciji smo združili oba peleta istega tretiranja.

### 3.2.8 Preverjanje koncentracije ekstrahiranih proteinov mitohondrijske frakcije (metoda po Bradfordu)

Metoda po Bradfordu je klasična metoda ugotavljanja koncentracije celokupnih proteinov v vzorcu (Bradford, 1976). Za določitev koncentracije smo morali vzorce citosolne frakcije redčiti petkrat, vzorce mitohondrijske frakcije pa dvakrat. Vzorce citosolne frakcije smo redčili tako, da smo  $10\mu\text{L}$  vzorca dodali  $40\mu\text{L}$  citosolnega ekstrakcijskega pufera z ditiotreitolom in inhibitorjem proteaz. Vzorce mitohondrijske frakcije smo redčili tako, da smo  $5\mu\text{L}$  vzorca mitohondrijske frakcije dodali  $5 \mu\text{L}$  bidestilirane vode ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ). Sledila je priprava petkrat redčenega Bradfordovega reagenta v bidestilirani vodi ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ). V vsako jamico mikrotiterske plošče smo nato k  $4 \mu\text{L}$  redčenega vzorca specifične frakcije (citosolne ali mitohondrijske) dodali  $196 \mu\text{L}$  petkrat redčenega Bradfordovega reagenta. Kot slepi vzorec za citosolno frakcijo smo upoštevali citosolni ekstrakcijski pufer z inhibitorjem proteaz in ditiotreitolom. Kot slepi vzorec za mitohondrijsko frakcijo smo upoštevali mitohondrijski ekstrakcijski pufer z inhibitorjem proteaz in ditiotreitolom. Vsak vzorec smo na mikrotitersko ploščo nanesli v dveh ponovitvah.

Sledilo je merjenje absorbance pri valovni dolžini  $595 \text{ nm}$  na čitalcu mikrotiterskih plošč Safire 2. Za vsak vzorec, ki smo ga nanesli mikrotitersko ploščo v dveh ponovitvah smo izračunali povprečni OD. Od povprečja OD vzorca smo nato odšteli povprečje OD slepega vzorca (referenčnega vzorca). Koncentracijo proteinov v vzorcu smo izračunali iz enačbe umeritvene krivulje:

$$y = 0,49689x + 0,01152 \quad \dots(1)$$

$$x = \frac{y - 0,01152}{0,49689} \quad \dots(2)$$

kjer je  $y$  razlika v povprečni absorbanci testnega in slepega (referenčnega) vzorca,  $x$  pa koncentracija proteinov v razredčenem vzorcu. Umeritvena krivulja je bila predhodno narejena v testnem vzorcu govejega serumskega albumina (BSA). Koncentracijo neredčenega vzorca proteinov v citosolni frakciji smo dobili tako, da smo vrednost redčenega vzorca pomnožili s pet (vzorec frakcije smo namreč ob meritvi petkrat redčili), koncentracijo neredčenega vzorca proteinov v mitohondrijski frakciji pa smo dobili tako, da smo vrednost redčenega vzorca pomnožili z dva (vzorec frakcije smo namreč ob meritvi dvakrat redčili). Podatek o koncentraciji je bil pomemben za določitev volumna vzorca frakcije ( $100 \mu\text{g}$ ) pri nanosu proteinov na trak, ki smo ga izvedli v okvru rehidracije trakov.

### 3.2.9 Prva dimenzija 2-D elektroforeze

1.dimenzija 2-D elektroforeze zajema dva osnovna sklopa, rehidracijo trakov in izoelektrično fokusiranje. V fazi rehidracije trakov poteka rehidracija trakov z vzorci proteinov, raztopljenih v pufru za rehidracijo z dodanim DTT. DTT proteine obdrži v reduciranem stanju. V procesu rehidracije se proteini naključno, vendar koncentracijsko enakomerno porazdelijo po traku. Pri določenem pH v pufru za rehidracijo pa variirajo v celokupnem naboju zaradi različne

aminokislinske sestave. Aminokislinska sestava namreč določa, koliko aminokislin bo oddalo in sprejelo vodikov proton, s tem pa določa celokupen naboј protein. Naboј protein je neodvisna spremenljivka sile, ki delujejo na protein ob vklopu električnega polja. Od sile, ki deluje na protein pa je odvisna njihova hitrost potovanja po gelu proti nasprotnemu polu. Ker imajo trakovi pH gradient, se celokupni naboј proteinov manjša ob potovanju proti nasprotnemu polu, dokler ne dosežejo lokacijo na gelu s pH, pri katerem je njihov celokupen naboј enak nič. Omenjen pH imenujemo izoelektrična točka proteina. Nenabitost proteinov (celokupen naboј protein je nič) pomeni, da na protein ne deluje več električna sila. Zato protein preneha potovati. Tako se proteini po traku z gradientom pH v fazi izoelektričnega fokusiranja razporedijo glede na izoelektrično točko.

### 3.2.9.1 Rehidracija trakov

Pri rehidraciji trakov smo uporabili že predpripravljene 2 mL alikvote pufra za rehidracijo, ki so bili hraničeni pri -20 °C. Preglednica 3 prikazuje sestavo pufra za rehidracijo.

Preglednica 3: Sestava pufra za rehidracijo

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE)	0,5 g	2 % (w/v)
IPG (GE)	500µL	2 % (w/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH <sub>2</sub> O do 25 mL		

Najprej smo pufer za rehidracijo odtalili pri sobni temperaturi in dodali 0,006 g DTT/ 2mL osnovnega pufra. V 1,5-mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 45 µL vzorcev mitohondrijske frakcije in 205 µL pufra za rehidracijo z DTT. Skupni volumen rehidracijske raztopine je moral biti 250 µL. Rehidracijske raztopine z vzorci mitohondrijske frakcije smo odpipetirali v pripradajoče reže podstavka, ki smo ga predhodno naravnali v ravnotežno pozicijo. S trakov, ki še niso bili popolnoma odtaljeni, smo z anodnega konca odstranili plastično folijo in ga z gelom navzdol (številka traku prav obrnjena) brez tvorbe mehurčkov položili v rehidracijsko raztopino. Režo s trakom smo nato prekrili s 3 mL mineralnega olja. Podstavek smo nato prekrili s pokrovom in pustili čez noč.

### 3.2.9.2 Izoelektrično fokusiranje

Po rehidraciji smo trake s pripadajočimi vzorci sprali v destilirani vodi (dH<sub>2</sub>O). Sprane trake smo nato položili na filter papir, obrnjene z gelom navzgor in jih osušili. Plošča za izoelektrično fokusiranje je povezana s termostatskim cirkulatorjem, ki zagotavlja konstantno temperaturo. Termostatski cirkulator preko cevi, skozi katere se pretaka voda uravanava temperaturo plošče za izoelektrično fokusiranje. Hkrati je preko cevi povezan z aparaturom za SDS-PAGE elektroforezo. Z ventili na ceveh smo zato preusmerili hladilni tok na aparaturom za

izoelektrično fokusiranje. Temperaturo smo na termostatskem cirkulatorju naravnali na 20°C. Na ploščo za izoelektrično fokusiranje, ki je povezana s termostatskim cirkulatorjem smo odpipetirali 5 mL mineralnega olja v vertikalnih črtah. Čez mineralno olje smo nato postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki. V podstavek smo nalili 10 mL mineralnega olja. V podstavek smo nato dali plastično ploščo z vdolbinami. V vdolbine plastične plošče smo položili trakove s pripadajočimi vzorci, obrnjene z gelom navzgor in pozitivnim koncem (anodnim delom) na zgornjem delu plošče. Nato smo odrezali dva elektrodna trakova tako, da je dolžina prekrila vse trakove, jih rahlo omočili z destilirano vodo ( $dH_2O$ ) in osušili na filter papirju. Elektrodna trakova smo namestili na konca trakov s pH gradientom. Čez trakova smo namestili elektrodi. Čez trakove smo nato nalili 130 mL mineralnega olja. Elektrodi smo priključili na usmernik in naravnali program. Program elektroforeze je bil sledeč:

1. faza: 0-300V, 1 min
2. faza: 300V, 1h
3. faza: 300-3500V, 1h 30 min
4. faza: 3500V, 5h

Po izvedbi izoelektričnega fokusiranja smo trakove vstavili v plastične mape in shranili pri -80 °C.

### 3.2.10 Druga dimenzija 2-D elektroforeze

2. dimenzija 2-D elektroforeze je sklop korakov v katerih proteine, ki so že ločeni glede na izoelektrično točko, ločimo še glede na molekulsko maso. Koraki, ki so vključeni zajemajo: vlivanje gelov, uravnoteženje trakov in SDS-PAGE elektroforeza.

#### 3.2.10.1 Vlivanje gelov

Pred vlivanjem gelov smo morali sestaviti kalup za vливанje. Na levi in desni rob ene plošče smo namestili distančnika debeline 1 mm, drugo ploščo pa smo naravnali na prvo. Na robova plošč smo nato namestili držalo. Plošči z držalom smo postavili navpično in jih naravnali, hkrati smo poskrbeli da so bili distančniki pravilno nameščeni na stranska robova plošč. Distančnika nista smela biti nameščena čez zgornja ali spodnja robova plošč. Plošči smo nato s pomočjo držal namestili na podstavek, ki smo ga predhodno premazali z gelom za tesnenje.

Po pripravi kalupa za vlivanje gela smo pripravili gel s koncentracijo akrilamida 12 % (w/v). Preglednica 4 prikazuje sestavo gela.

Preglednica 4: Sestava raztopine za poliakrilamidni gel

Sestavina	Količina za dva gela
Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %) (Sigma)	15,7 mL
1,5 M raztopina Tris-HCl	9,8 mL
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 mL
Bidestilirana voda (ddH <sub>2</sub> O)	13,0 mL
10 % (w/v) raztopina APS	195 µL
TEMED (Sigma)	13 µL

Priprava 1,5 M raztopina Tris-HCl vključuje zatehtanje 36,3 g Tris-baze (Sigma). Nato dolijemo 150 mL bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O), s HCl uravnamo pH na 8,8 in dodamo bidestilirano vodo do 200 mL. 10 % (w/v) raztopino SDS pripravimo tako, da 10 g SDS (Sigma) dolijemo do 100 mL bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O). Pri pripravi 10 % (w/v) raztopine APS pa 0,1 g APS (Sigma) dodamo do 1 mL bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O) in hranimo v alikvotih na -20 °C.

Pri pripravi raztopine za gel smo najprej odpipetirali raztopino akrilamida/bisakrilamida, 1,5 M raztopino Tris-HCl, 10 % (w/v) raztopino SDS in bidestilirano vodo (ddH<sub>2</sub>O). Sledilo je razplinjanje raztopine v ultrazvočni kopeli 10 min. Nato smo dodali APS in TEMED. APS (amonijev persulfat) deluje kot iniciatorski radikal, TEMED pa kot katalizator reakcije polimerizacije. Vsebino smo nato narahlo premešali. Z ročno pipeto smo odpipetirali 19 mL raztopine v kalup med stekleni plošči. Nato smo na zgornjo površino odpipetirali plast bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O) do 1 cm pod zgornjim robom. Voda je gelu onemogočila stik s kisikom in s tem zagotovila enakomerno polimerizacijo. Gel smo pustili polimerizirati čez noč.

### 3.2.10.2 Uravnoteženje trakov

V prvi fazi postopka uravnoteženja trakov smo pripravili dve ločeni raztopini za uravnoteženje iz osnovnega pufra za uravnoteženje. Preglednica 5 prikazuje sestavo osnovnega pufra za uravnoteženje za 50 mL pufra. Za uravnoteženje enega traku ustreza 10 mL osnovnega pufra za uravnoteženje.

Preglednica 5: Sestava 50 mL osnovnega pufra za uravnoteženje

Sestavina	Količina za 50 mL pufra
1,5 M raztopina Tris-HCl	2,5 mL (75 mM)
urea (Sigma)	18g (6M)
glicerol (Sigma)	15 mL (30% (w/v))
SDS (Sigma)	1g (2% (w/v))
Bromofenol modro (Sigma)	1 kristalček (0,002% (w/v))
Dodamo bidestilirano vodo (ddH <sub>2</sub> O) do 50 mL	

Prvi pufer za uravnoteženje, ki ga pripravimo iz osnovnega pufra vsebuje 65 mM DTT, ki proteine obdrži v reduciranjem stanju. Pripravili smo ga tako, da smo 20 mL osnovnega pufra za uravnoteženje (kar je ustrezalo uravnoteženju dveh trakov) dodali 0,2 g DTT (Sigma). DTT smo zatehtali v falkonko, kamor smo nato dolili pufer za uravnoteženje. Drugi pufer za uravnoteženje je vseboval 260 mM jodacetamid, ki alkilira -SH vezi in s tem prepreči njihovo oksidacijo. Pripravili smo ga tako, da smo 20 mL osnovnega pufra za uravnoteženje (kar je ustrezalo uravnoteženju dveh trakov) dodali 0,96 g jodoacetamida (JAA). Oba pufra smo porazdelili po 10 mL v dve epruveti.

Pred uravnoteženjem smo trakove petkrat sprali z 1xSDS. Pripravili smo ga z redčenjem iz 5x SDS. Preglednica 6 prikazuje njegovo sestavo.

Preglednica 6: Sestava 5x SDS raztopine

Sestavina	Količina
Tris-baza (Sigma)	15,0 g (260 mM)
Glicin (Merck)	72,0 g (960 mM)
SDS (Sigma)	5,0 g (0,5% (w/v))
Dodamo bidestilirano vodo (ddH <sub>2</sub> O) do 1000 mL	

Trakove smo nato prestavili v epruvete z 10 mL pufra za uravnoteženje z DTT. Sledila je inkubacija 15 min na stresalni plošči. Po inkubaciji v pufru z DTT je sledilo 15 min inkubacije v pufru z JAA. Po uravnoteženju smo trakove prenesli na filterpapir z gelom navzgor. Plastični rob trakov smo na katodnem (-) koncu odrezali, da smo jih lažje vstavili v steklen kalup.

### 3.2.10.3 SDS-PAGE elektroforeza

SDS-PAGE elektroforeza je bila sestavljena iz dveh sklopov. Prva faza SDS-PAGE elektroforeze je zajemala prenos trakov na pripravljen ločilni gel. Ločilne gele smo najprej osušili z rahlim segrevanjem s fenom. Na površino ločilnega gela smo nato odpipetirali predpripravljeno agarozno raztopino, ki smo jo predhodno raztoplili oz. segreli na 100 °C v mikrovalovni pečici. Agarozna raztopina se pripravi tako, da se 0,5 g agaroze (Sigma),

zatehtane v infuzijsko steklenico doda 100 mL 1xSDS pufra, raztopi v mikrovalovni pečici in doda kristalček barvila bromofenol modro.

Po pipetiranju agarozne raztopine smo vstavili trakove z vzorci mitohondrijske frakcije in jih namestili na površino ločilnega gela. V približno 20 min, se je agaroza strdila. Po strjevanju smo kalup namestili na novo stojalo z elektrodnimi priključki in v posodo za SDS-PAGE elektroforezo. Posodo smo zapolnili z 1xSDS elektroforeznim pufrom. Pred vključitvijo usmernika smo ventile cevi termostatkega cirkulatorja naravnali tako, da je bilo uravnavanje temperature tokrat usmerjeno na posodo za SDS-PAGE elektroforezo, termostatski cirkulator pa smo naravnali na temperaturo 15 °C. Nato smo elektrodi priključili na usmernik in izbrali program. Elektroforeza je potekala najprej 15 min pri konstantnem toku 20 mA/gel, nato pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler ni barvilo bromofenol modro doseglo ravnnino približno 3 mm pred spodnjim robom gela. Po elektroforezi smo gele odstranili iz kalupa. Sledilo je barvanje 2-D gelov s SYPRO Ruby barvilom.

### 3.2.11 Barvanje 2-D gelov s SYPRO Ruby barvilm

Barvanje 2-D gelov s SYPRO Ruby barvilm je bilo sestavljeni iz štirih faz: fiksacija, barvanje, razbarvanje in spiranje. Pred fiksacijo smo gele, ki smo jih odstranili iz kalupa označili z odrezanjem roba in jih položili v posodo s fiksacijsko raztopino (150 mL fiksacijske raztopine za en gel, 250 mL fiksacijske raztopine za dva gela). Fiksacijsko raztopino smo pripravili tako, da smo v 1000 mL stekleno bučko z merilnim valjem odmerili 500 mL 100 % (v/v) metanola in 70 mL 100 % ocetne kisline in dolili do 1000 mL bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O). Geli so se fiksirali dvakrat po 30 min na stresalniku, pri čemer smo med zaporednima fiksacijama zamenjali fiksacijsko raztopino s svežo. Po fiksaciji je sledilo barvanje čez noč v SYPRO Ruby barvili (250 mL za dva gela oz. 150 mL za en gel). SYPRO Ruby je dobra izbira za barvilo, saj je specifično in neselektivno. Spodnja meja detekcije barvila je 1-2 ng proteina. Ker je intenziteta fluorescence proporcionalna količini proteina v elektroforetski lisi, lahko proteine kvantitativno ovrednotimo (Görg in sod., 2000). Barvanju je sledilo razbarvanje v raztopini za razbarvanje (250 mL za dva gela oz. 150 mL za en gel). Raztopino za razbarvanje smo pripravili tako, da smo v 1000 mL stekleno bučko z merilnim valjem odmerili 100 mL 100% (v/v) metanola in 70 mL 100 % ocetne kisline in dolili do 1000 mL bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O). Geli so se razbarvali dvakrat po 30 min na stresalniku pri čemer smo med zaporednima razbarvanjema zamenjali raztopino za razbarvanje s svežo. Razbarvanju je sledilo trikratno spiranje po 5 min bidestilirane vode (ddH<sub>2</sub>O) (250 mL za dva gela oz. 150 mL za en gel) z vmesnim menjavanjem vode. Po prenestitvi gelov v četrto vodo je sledilo slikanje gelov.

### 3.2.12 Slikanje gelov

Slikanje gelov je potekalo na aparaturi za slikanje SynGene. Aparatura ima odstranljivo ploščo, ki z virom svetlobe gel osvetli od spodaj. Aparatura je z računalnikom povezana preko programa GeneSnap. Programu smo najprej dali navodilo, da želimo videti dejansko sliko gela v merilu 1:1. Odprtost zaslonke smo nastavili na f1,2 (s tem smo nastavili svetlost, ostrino in

kontrast slike), povečavo oz. "zoom" na vrednost 12.5, goriščno razdaljo leče (razdaljo med optičnim središčem leče in njenim goriščem) na 143 mm in čas osvetlitve (ali čas odprtosti zaslonke) na 100 ms (s tem smo uravnali dolžino časovnega intervala, v katerem je zaslonka ostala odprta). Po slikanju smo gele shranili v plastične mape, ki smo jih zavarili.

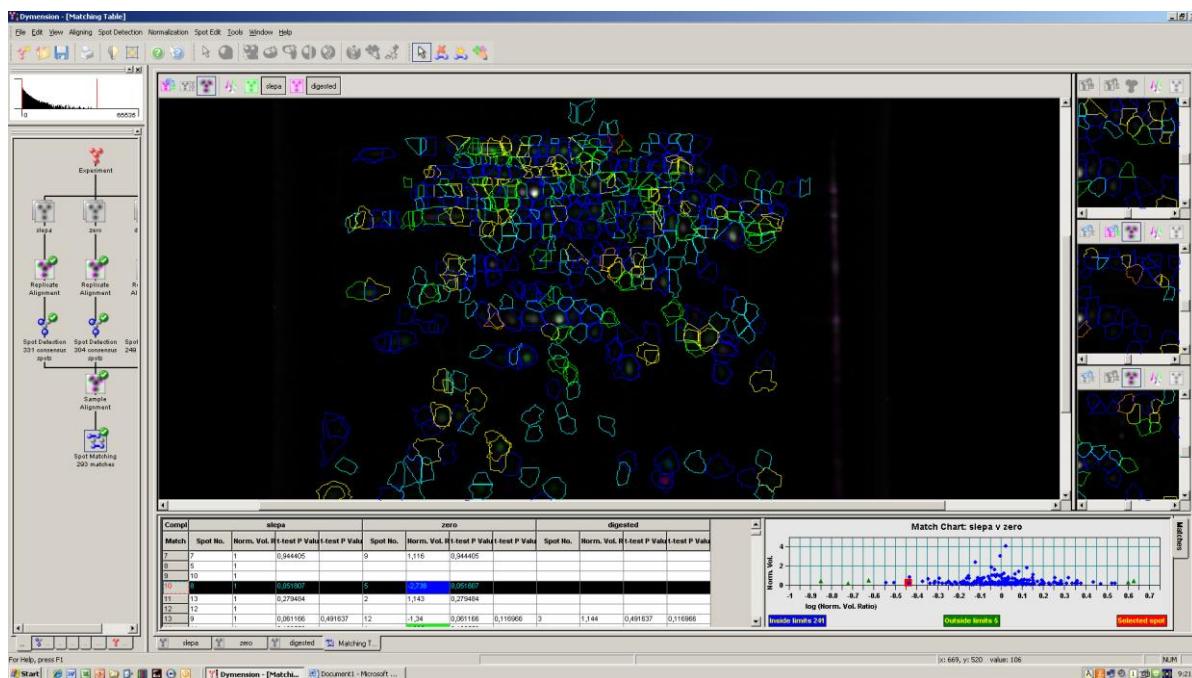
### 3.2.13 Analiza gelov in identifikacija diferencialno izraženih proteinov

Ker dobimo najrealnejšo sliko vplivov polifenolov na diferencialno izražanje proteinov, če primerjamo ekstrakt pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta z ozadjem ekstrakta (brez polifenolov), smo se odločili iz analize izpustiti kontrolo. Ravnotako pri analizi nismo upoštevali vseh treh tehničnih ponovitev, temveč zgolj, dve, ki sta pri posamezni biološki ponovitvi najbolj verodostojni (slike gelov so najbolj jasne). Analiza je potekala s programom 2-D Dymension (SynGene). Program uporabnika sistematično vodi skozi postopek statistične obdelave gelov. Izrisuje diagram opravil, ki jih je uporabnik že opravil in, ki jih še mora. V program smo najprej po skupinah naložili sgd datoteke vseh slik gelov, ki jih nameravamo analizirati. Skupine smo oblikovali glede na biološke ponovitve in v posamezno skupino naložili obe biološki ponovitvi vsakega tretiranja. Nato smo prilagodili polje, katerem bo program zaznaval elektroforetske lise. Sledila je nastavitev pogojev detekcije, med katere sodi stopnja zaupanja detekcije "Detection Confidence ratio". Nastavili smo jo na vrednost 10. Nato smo programu naročili, naj prične s primerjavo gelov med biološkimi ponovitvami. Biološki ponovitvi ozadja ekstrakta sta bili najprej naloženi v program, ker program ostale biološke ponovitve (v našem primeru ponovitve ekstrakta pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta) primerja s prvo naloženo biološko ponovitvijo. Program je pri primerjavi za vsako elektroforetsko liso izbral površino, ki ločuje protein od ozadja. Površina se imenuje volumen točke ali "spota". Po določitvi je program za vsako točko (spot) izračunal normaliziran volumen tako, da je volumen točke delil z skupnim volumenom vseh točk znotraj polja, ki smo ga določili. Izračun opisuje enačba:

$$V_N[\%] = \frac{V_i}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad \dots(3)$$

kjer je  $V_N$ , normaliziran volumen,  $V_i$  pa volumen posamezne elektroforetske lise. Znotraj obh bioloških ponovitev istega tretiranja je izračunal povprečni normalizirani volumen. Nato je povprečni normalizirani volumen ekstraktov pred in po izpostavitvi modelu prebavnega trakta delil s povprečnim normaliziranim volumenom ozadja ekstrakta. S tem je izračunal razmerje povprečnih normaliziranih volumnov. Za vsako točko se je izmerila tudi intenziteta osvetljenosti, ki jo je program izrazil kot pripadajočo višino vrha. Višino vrha je zmnožil z normaliziranim volumenom vsakega proteina oz. vsake točke na gelu in s tem izračunal podatek intenzitete izražanja. Sledil je izračun povprečne intenzitete izražanja za vsako biološko ponovitev. Z izračunom količnika povprečne intenzitete izražanja ekstraktov pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta z ozadjem ekstrakta je program prodobil podatek o povišanju ali znižanju izražanja proteina glede na ozadje ekstrakta. Program je izračunal tudi t-statistiko primerjeve dveh neodvisnih populacij. S tem so bili pridobljeni surovi podatki. Podatki so dobili pomen šele, ko smo postavili zgornjo in spodnjo mejo spremembe v

intenziteti izražanja. Za zgornjo mejo (angl. *Upper Fold Increase*) povišanja (angl. *upregulation*) in znižanja izražanja (angl. *downregulation*) smo izbrali vrednost 10. Iz zaznavanja smo s tem izključili proteine, ki so v testnih vzorcih več kot desetkrat bolj ali manj izraženi, kot v referenčnem vzorcu (slepi vzorec). Za spodnjo mejo (angl. *Upper Fold Increase*) povišanja (angl. *upregulation*) in znižanja izražanja (angl. *downregulation*) smo izbrali vrednost 1,5. Iz zaznavanja smo s tem izključili proteine ki so v testnih vzorcih manj kot 1,5-krat bolj ali manj izraženi, kot v referenčnem vzorcu (slepi vzorec). Vrednosti za vsako elektroforetsko liso smo dobili v obliki tabele. Vsaka elektroforetska lisa je imela določeno število, skupno vsem biološkim ponovitvam (angl. *match number*). Izpostavili smo statistične vrednosti elektroforetskih lis, ki ustrezajo zahtevanim pogojem. Slika 5 predstavlja analizo gelov s programom 2-D Dymension (SynGene).



Slika 5: Analiza gelov s programom 2-D Dymension (Syngene), prikazan je primer lise s številko ujemanja 10; združevanje gelov slepih vzorcev in vzorcev ekstraktov po prehodu skozi model prebavnega trakta

V naslednji fazi analize smo izbrane točke označili najprej na gelih, ki so bili vključeni v statistično obdelavo, nato še na preostalih gelih. Izločili smo izbrane točke, ki bi jih na gelu bilo težje izločiti, ali so slabo vidni. Ostale točke so bile izbrane za izrez.

### 3.2.14 Izrez diferencialno izraženih proteinov

Izrez diferencialno izraženih proteinov je potekal s pomočjo UV transiluminatorja. Za pripadajočo številko izbrane elektroforetske lise (skupne vsem biološkim ponovitvam) smo poiskali mesto na osvetljenem gelu in na lokacijo pritisnili s konico odrezanega tipsa. S tem smo protein zajeli v tips, vsebino pa s puhaliko izpraznili v označeno mikrocentrifugirko. V mikrocentrifugirkah smo zbirali vse vzorce proteina. Na identifikacijo z masno spektrometrijo

(MS) smo poslali vzorce proteinov s sledečimi številkami, skupnimi vsem biološkim ponovitvam (angl. *mach number*): 10, 22, 47, 109, 152, 153, 170, 246, 408, 248, 249, 273, 303, 285, 279. Identifikacija je bila izvedena na Danskem (DTU Food, National Food Institute, Division of Industrial Food Research)

### **3.2.15 Bioinformacijska obdelava podatkov**

Bioinformacijska obdelava podatkov je potekala s pomočjo podatkovnih zbrk UniProt (Bairoch in sod., 2005), KEGG (Kanehisa in Goto, 2000), Pfam (Punta in sod., 2007) in NCBI (Maglot in sod., 2007). V excelovi datoteki smo dobili podatke z imenom proteina, imenom organizma, številom peptidov v vzorcu (tretiranem s tripsinom), ki se prekrivajo z aminokislinsko sekvenco, številom zadetkov (angl. *score*) in linkom do originalne datoteke analizatorja Mascot. Za vsak protein smo izpisali podake zaporednega števila ujemanja (angl. *mach number*), teoretično izolelektrično točko in molekulsko relativno maso prodobljeno izolelektrično točko in molekulsko relativno maso, številom aminokislin, oznako gena z lokacijo na kromosому, funkcijo proteina, oznako človeškega ortologa, odstotkom homologije med človeško nukleotidno in aminokislinsko sekvenco in nukleotidno in aminokislinsko sekvenco kvasovke *S. cerevisiae* S288c (sev ZIM2155). Primerjave med aminokislinskima in nukleotidnima sekvencama smo naredili v programu CLUSTALW (Larkin in sod., 2007).

## 4 REZULTATI

### 4.1 KONCENTRACIJE EKSTRAHIRANIH PROTEINOV MITOHONDRIJSKE FRAKCIJE

Preglednica 7: Rezultati meritve koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu

VZOREC	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	POVPREČJE ABSORBANCE	A <sub>595</sub> - A <sub>slepa</sub>	KONC. REDČ. VZ.	KONC. NEREDČ. VZORCA
DS <sub>1</sub> C	0,586	0,566	0,576	0,164	0,306	1,53
ZS <sub>1</sub> C	0,576	0,576	0,576	0,163	0,305	1,52
S <sub>1</sub> C	0,606	0,592	0,599	0,185	0,350	1,75
DS <sub>1</sub> M	0,991	1,000	0,995	0,603	1,190	2,38
ZS <sub>1</sub> M	0,831	0,813	0,822	0,430	0,841	1,68
S <sub>1</sub> M	0,760	0,801	0,780	0,388	0,757	1,51
K <sub>2</sub> C	0,615	0,652	0,633	0,191	0,361	1,80
DS <sub>2</sub> C	0,723	0,693	0,708	0,266	0,512	2,56
ZS <sub>2</sub> C	0,703	0,615	0,659	0,217	0,413	2,06
S <sub>2</sub> C	0,671	0,686	0,679	0,236	0,452	2,26
K <sub>2</sub> M	0,833	0,815	0,824	0,432	0,846	1,69
DS <sub>2</sub> M	0,722	0,676	0,699	0,307	0,594	1,19
ZS <sub>2</sub> M	0,675	0,610	0,643	0,250	0,480	0,96
S <sub>2</sub> M	0,834	0,422	0,832	0,442	0,866	1,73
K <sub>3</sub> C	0,678	0,648	0,663	0,221	0,421	2,11
DS <sub>3</sub> C	0,688	0,663	0,675	0,233	0,446	2,23
ZS <sub>3</sub> C	0,665	0,679	0,672	0,236	0,451	2,26
S <sub>3</sub> C	0,679	0,628	0,654	0,216	0,411	2,05
K <sub>3</sub> M	0,587	0,630	0,609	0,190	0,359	0,72
DS <sub>3</sub> M	0,720	0,606	0,663	0,244	0,469	0,94
ZS <sub>3</sub> M	0,749	0,687	0,718	0,299	0,579	1,16
S <sub>3</sub> M	0,800	0,772	0,786	0,367	0,716	1,43
CP+	0,416	0,411	0,413	/	/	/
CP+	0,444	0,443	0,443	/	/	/
MP+	0,407	0,378	0,392	/	/	/
MP+	0,420	0,417	0,419	/	/	/

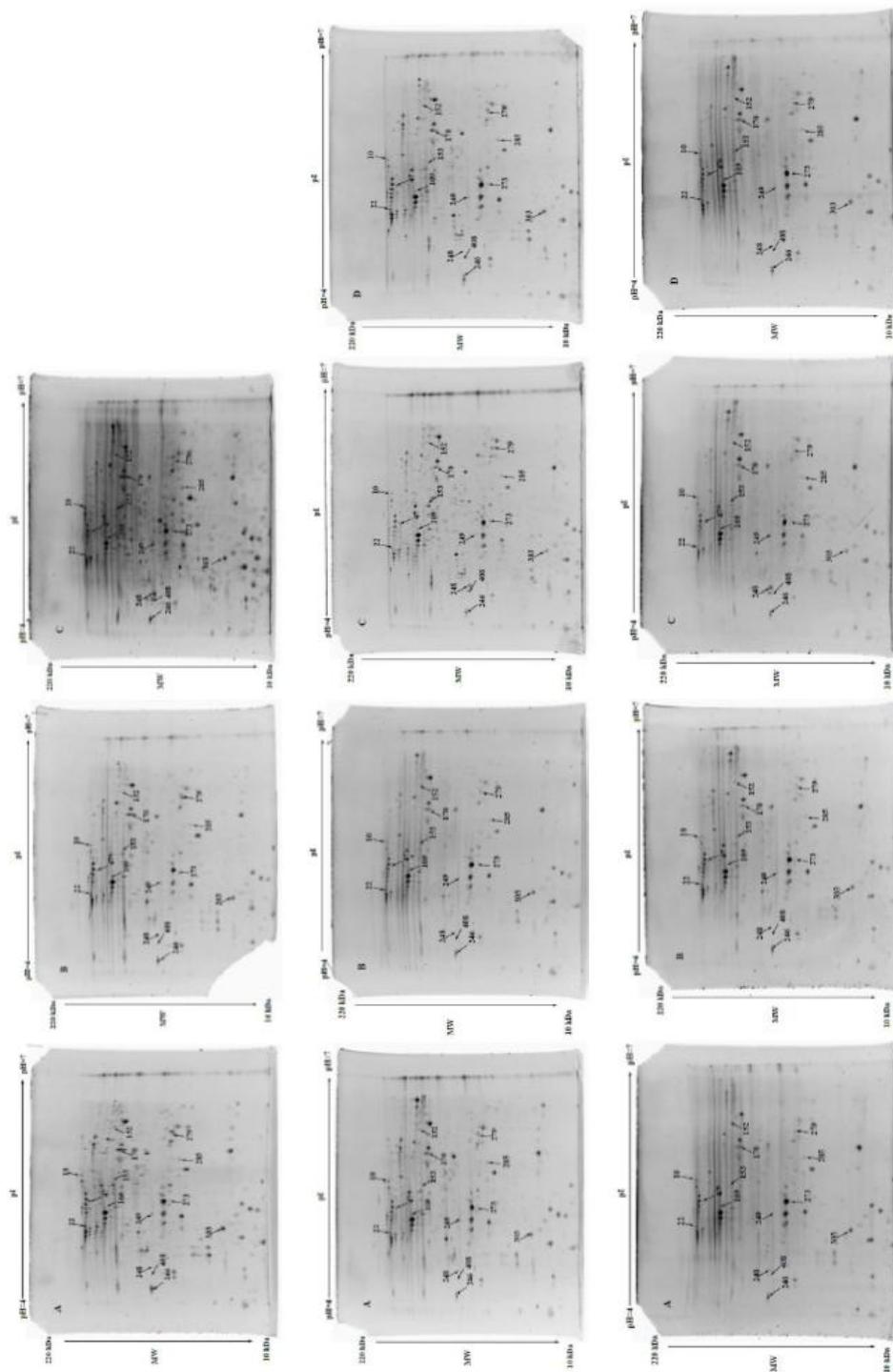
#### LEGENDA:

- S- ozadje ekstrakta
- K- kontrola (PBS)
- ZS- ekstrakt pred prehodom skozi model prebavnega trakta – intaktni ekstrakt
- DS- ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta – modificiran ekstrakt
- 1- 1. biološka ponovitev
- 2- 2. biološka ponovitev
- 3- 3. biološka ponovitev
- C- citosolna frakcija
- M- mitohondrijska frakcija

Glede na rezultate metode po Bradfordu smo se odločili, da nadaljujemo raziskave samo z vzorci mitohondrijske frakcije. Koncentracija proteinov citosolne frakcije je bila namreč premajhna. Koncentracija mitohondrijske frakcije pa se je gibala nekje med 1,5 - 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Preglednica 7).

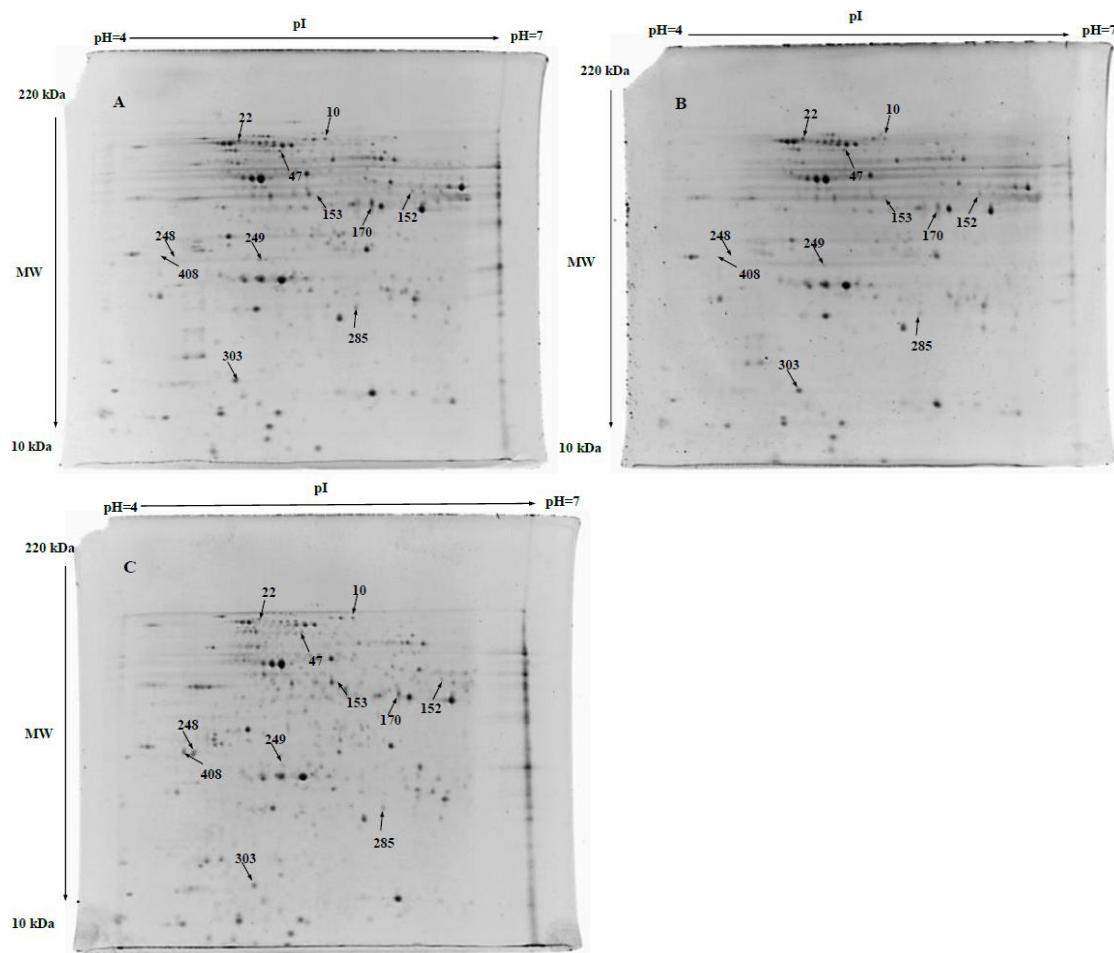
#### 4.2 SLIKE GELOV Z DIFERENCIALNO IZRAŽENIMI ELEKTROFORETSKIMI LISAMI

Slike gelov z diferencialno izraženimi proteini smo prikazali na dva načina. Slika 6 predstavlja proteomski profil vseh bioloških ponovitev na proteinih mitohondrijske frakcije. Označeni so vsi proteini, ki so bili poslani na identifikacijo. Slika 7 prikazuje reprezentativni proteomski profil kvasovke za vsako od bioloških ponovitev. Prikazani so proteini, ki so bili uspešno identificirani.



3. BIOLÓSKA PONOVIITEV 2. BIOLÓSKA PONOVIITEV 1. BIOLÓSKA PONOVIITEV

Slika 6: Proteinski profil kvasovke po izpostavitvi ekstraktom: A) ozadje ekstrakta (S), B) ekstrakt pred prehodom skozi model prebavnega trakta (ZS), C) ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta (DS), D) kontrola (PBS) (K)



Slika 7: Reprezentativni proteomski profil kvasovke ob izpostavitvi ekstraktom: A) ozadje ekstrakta (S), B) ekstrakt pred prehodom skozi model prebavnega trakta (ZS), C) ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta (DS)

#### 4.3 PREGLEDNICA Z REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE

Prikazani so rezultati statistične obdelave za protein, ki so bili identificirani (Preglednica 8).

Preglednica 8: Rezultati t-testa, razmerje normaliziranih volumnov (NVR) s pripadajočo številko elektroforetske lise, ki je skupna vsem biološkim ponovitvam

	OZADJE EKSTRAKTA (angl. <i>BLANK SAMPLE</i> )	EKSTRAKT PRED PREHODOM SKOZI MODEL PREBAVNEGA TRAKTA (angl. <i>ZERO SAMPLE</i> )	EKSTRAKT PO PREHODU SKOZI MODEL PREBAVNEGA TRAKTA (angl. <i>DIGESTED SAMPLE</i> )		
Št. elektroforetske lise	NVR	NVR	t-test (p vrednost)	NVR	t-test (p vrednost)
10	1	-2,74	0,052	/	/
22	1	1,09	0,49	-2,79	0,06
47	1	-1,50	0,40	-2,13	0,07
152	1	1,06	0,05	-1,51	0,07
153	1	1,43	0,59	2,93	0,08
248	1	/	/	9,25	0,02
249	1	1,05	0,86	-1,50	0,01
285	1	-1,55	0,02	-1,52	0,11
408	/	/	/	de novo sinteza	/
170	1	-1,08	0,76	-1,50	0,08
303	1	-1,00	1,00	-1,60	0,06

LEGENDA:

/ – lisa ni bila detektirana

#### 4.4 REZULTATI BIOINFORMACIJSKE OBDELAVE

Preglednica 9: Protein pod zaporednim številom ujemanja, njegovi pripadajoči teoretični in pridobljeni pI, Mw in pripadajoči odstotek homologije s človeškim proteinom

MACH ŠTEVIL IME PROTEINA	GEN	UniProt KODA	SCORE	ŠT. PEPT.	ŠT. AK	pI <sub>T</sub>	Mw <sub>T</sub>	FUNKCIJA	ČLOV ORTOLOG	% HOM S ČLOV G. (ClustalW SCORE)	% HOM S ČLOV P. (ClustalW SCORE)	
10	Heat shock protein STI 1 (Sti1)	STI1 (kromosom 15)	P15705	408	3	589	5,45	66395	odziv celice na stres	STIP1 (kromosom 11; 11q13)	63,42	35,359
22	Hsp70 family ATPase Ssa3	SSA3 (kromosom 2)	P09435	419	4	649	5,05	70618	odziv celice na stres	HSPA1_8 (kromosom 6)	61,03 (z HSPA1A)	72,6006
47	Transcription modulator WTM1 (Wtm1)	WTM1 (kromosom 15)	Q12363	277	3	437	5,18	48467	-vpliv na oksidacijsko stanje DNA -reprezija mejotske redukcijске delitve -negativna regulacija utišanja HMR lokusa	/	/	11,5566
152	Peptidil-prolin cis-trans isomerase CPR6 (YLR216C)	CPR6 (kromosom 7)	P53691	52	1	371	5,83	42430	-odziv na stress z izomerizacijsko aktivnostjo prolilnih peptidnih vezi	PPID (kromosom 4)	51,57	40,5405

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 9: Protein pod zaporednim številom ujemanja, njegovi pripadajoči teoretični in pridobljeni pI, Mw in pripadajoči odstotek homologije s človeškim proteinom

MACH ŠTEVILLO	IME PROTEINA	GEN	KODA UniProt	SCORE	ŠT PEPT.	ŠT. AK	pI <sub>T</sub>	Mw <sub>T</sub>	FUNKCIJA	ČLOV ORTOLOG	% HOM S ČLOV G. (Clustal W SCORE)	% HOM S ČLOV P. (Clustal W SCORE)
153	Actin	<i>ACT1</i>	P60010	205	2	375	5,53	41907	-acetilacija histonov (vpliv na obnovo DNA in transkripcijo) -mejotska redukcija delitev (kontrakcija aktomiozinskega obroča) -polarizacija celične rasti -transport veziklov, organelov in struktur (endocitoza, eksocitoza, dedovanje mitochondrijev, orientacija nit delitvenega vretena, usmerjanje kromosomov)	<i>ACTB</i> (kromosom 7) <i>ACTG1</i> (kromosom 17) <i>ACTG2</i> (kromosom 2)	71,72 (z <i>ACTB</i> ) 73,4 (z <i>ACTG1</i> ) 69,77 (z <i>ACTG2</i> )	88,08(z <i>ACTB</i> )
170	Fructose- biphosphat e aldolase	<i>FBA1</i> (kromo so m 11)	P14540	155	2	359	5,51	39881	-glikoliza -glukoneogeneza -kalvinov cikel	<i>ALDOC</i> (kromosom 17)	46,3	13,3705

se nadaljuje

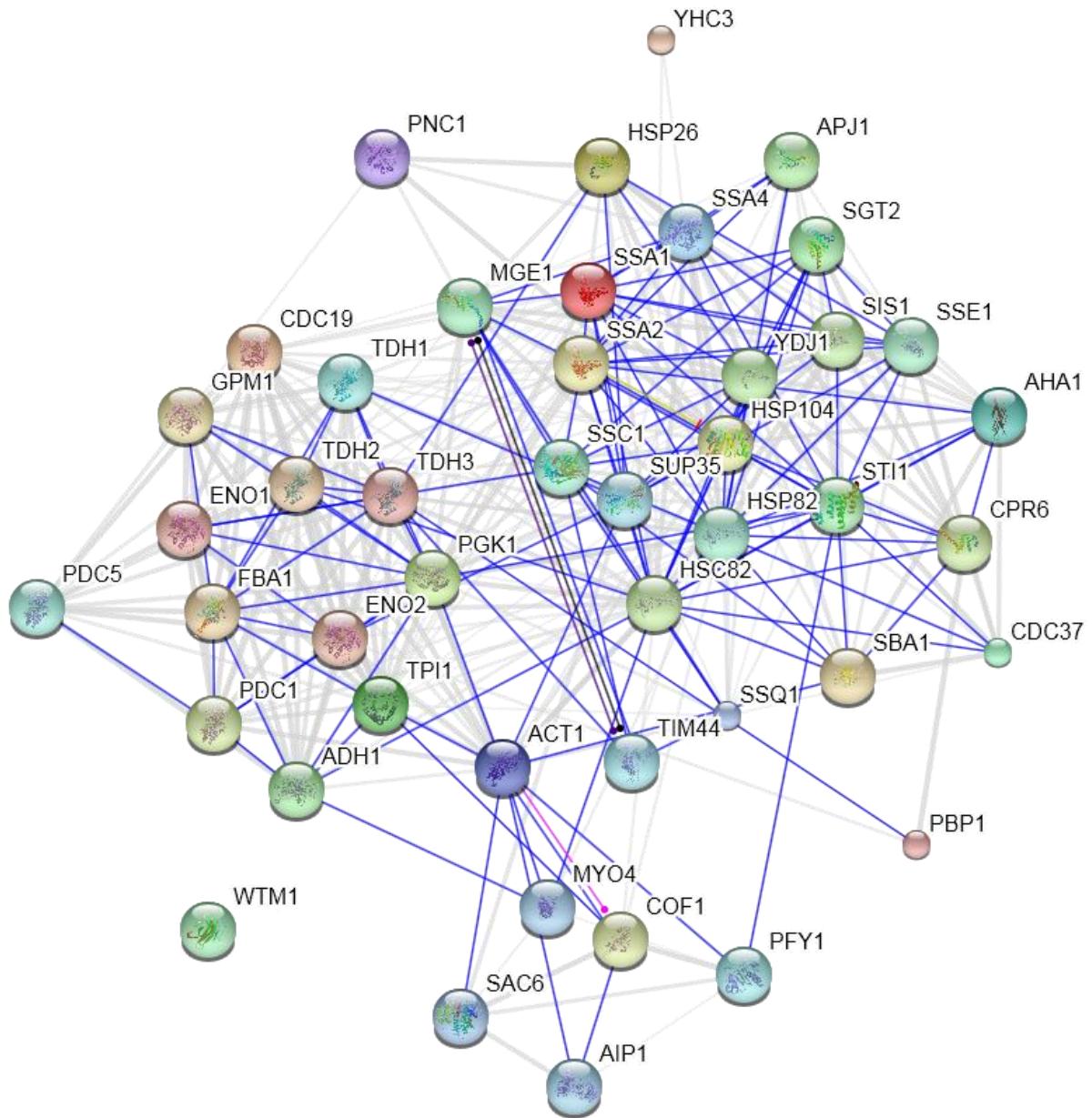
nadaljevanje Preglednica 9: Protein pod zaporednim številom ujemanja, njegovi pripadajoči teoretični in pridobljeni pI, Mw in pripadajoči odstotek homologije s človeškim proteinom

MACH ŠTEVILO	IME PROTEINA	GEN	UniProt KODA	SCORE	ŠT. PEPT.	ŠT. AK	pI <sub>T</sub>	Mw <sub>T</sub>	FUNKCIJA	ČLOV ORTOLO G	% HOM S ČLOV G.	% HOM S ČLOV P.
										(Clustal W SCORE)	(Clustal W SCORE)	
408	Hsp70 Ssa1	SSA1 (kromoso m 1)	/	48	1	?637- 642	5,00	69896	-odziv na stres	HSPA1_8 (kromoso m 6) <i>HSPA1A</i>	65,01 (z /	
248	Hsp70 Ssa1	SSA1 (kromoso m 1)	/	177	2	?637- 642	5,00	69896	-odziv na stres	HSPA1_8 (kromoso m 6) <i>HSPA1A</i>	65,01 (z /	
249	F1 ATPase (Atp2)	ATP2 (kromoso m 10)	/	70	1	/	5,71	54947	-transport H <sup>+</sup> ionov F tip transporterja	ATP5B (kromoso m 12) <i>CFL1</i>	60,87 47,69	/
303	Cofilin- 1(Cof1p)	COF1 (kromoso m 12)	Q03048	273	2	143	5,05	15948	-depolimerizacija in ločevanje aktina		32,8671	
285	Hsp70 Ssb1	SSB1 (kromoso m 4)	P11484	82	1	613	5,32	66732	-odziv na stres	HSPA1_8 (kromoso m 6) <i>HSPA1A</i>	57,93(z /	58,075

## LEGENDA:

SCORE-	vrednost ob primerjavi peptidov z aminokislinsko sekvenco v podatkovnih bazah
ŠT. PEPT-	število peptidov
ŠT.AK-	število aminokislin
pI <sub>T</sub> -	teoretična izolelektrična točka
Mw <sub>T</sub> -	teoretična molekulska relativna masa
ČLOV. ORTOLOG-	človeški ortolog
%HOM. S ČLOV. G.-	odstotek homologije s človeškim genom
%HOM. S ČLOV. P.-	odstotek homologije s človeškim proteinom

#### 4.5 SLIKA PROTEINSKIH INTERAKCIJ (STRING)



Slika 8: Interakcije diferencialno izraženih proteinov ob tretiranju kvasovke *S. cerevisiae* z ekstraktom, pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta in njihovi funkcionalni partnerji (Von Mering in sod., 2003)

Preglednica 10: Oznaka proteina v interakcijski mreži STRING, njegovo ime in funkcija

OZNAKA PROTEINA	IME IN FUNKCIJA
SSA1	Protein toplotnega šoka SSA (Hsp70 poddružine SSA1)- transport proteinov skozi membrano mitohondrija v endoplazmatski reticulum (642 aminokislin)
CDC19	Piruvat kinaza 1 (EC 2.7.1.40) (500 aminokislin)
HSP26	Protein toplotnega šoka 26 (26kDa) (214 aminokislin)
PGK1	Fosfoglicerat kinaza (EC 2.7.2.3) (416 aminokislin)
TPI1	Triozafosfat izomeraza (EC 5.3.1.1) (248 aminokislin)
CDC37	Hsp90 košaperon Cdc37 (506 aminokislin) (angl. <i>cell division control protein</i> ). Omogoča interakcijo kinaz s Hsp proteini
AHA1	Hsp90 košaperon AHA1- veže na šaperon HSP82 in stimulira njegovo ATPazno aktivnost (350 aminokislin)
SSA4	Protein toplotnega šoka SSA4 (dužina Hsp70) (642 aminokislin)
ACT1	Aktin (375 aminokislin)
PNG1	Nikotinamidaza (EC 3.5.1.19) (216 aminokislin), katalizira deamidacijo nikotinamide
PBP1	PAB1 (angl. poly (A) nuclease binding protein 1; omogoča primerno poliadenilacijo mRNA) (722 aminokilsin)
TDH3	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza 3 (EC 1.2.1.12) (332 aminokislin)
ENO1	Enolaza 1 (EC 4.2.1.11) (437 aminokislin)
ENO2	Enolaza 2 (EC 4.2.1.11) (437 aminokislin)
YHC3	Protein BTN1 precursor, vloga pri transport arginina v vakuolah, pH homeostazi (408 aminokislin)
TDH2	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza 2 (EC 1.2.1.12) (332 aminokislin)
FBA1	Fruktoza-bifosfat aldolaza (EC4.1.2.13) (216 aminokislin)
SBA1	Košaperon SBA1 (216 aminokislin)
GPM1	Fosfoglicerat mutaza 1(EC 5.4.2.1) (247 aminokislin)
SSA2	Protein toplotnega šoka SSA2 (Hsp 70 poddružine SSA2), vloga pro prenosu polipeptidov preko mitohondrijske membrane v endoplazmatski reticulum (639 aminokislin)
HSP104	Protein toplotnega šoka 104, potreben za disociacijo agregatov in ponovno zvitje proteinov (908 aminokislin)
COF1	Kofilin (Aktin depolimerizirajoč faktor 1); vloga pri reverzibilni polimerizaciji aktina (143 aminokislin)
PDC1	Piruvat dekarboksilaza izoencim 1 (EC 4.1.1.1); ena izmed treh glavnih piruvat dekarboksilaz (PDC1, PDC5 in PDC6) (563 aminokislin)
CPR6	Peptidil-prolil cis/trans izomeraza CPR6 (EC 5.2.1.8) (PPIaza), vloga pri pospeševanju zvitja proteinov s katalizo izomerizacije prolina (371 aminokislin)
HSC82	Protein toplotnega šoka 90 (Hsp90); konstitutivno izražena izoforma vključena v zorenje, pravilno zvitje in regulacijo, ohranjanje strukture (705 aminokislin)
SIS1	Protein SIS1; vloga pri migraciji jedra med mitozo, potreben za normalno iniciacijo translacije (352 aminokislin)
YDJ1	Mitohondrijski import protein MAS5 (prokariotski homolog) (409 aminokislin)

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 10: Oznaka proteina v interakcijski mreži STRING, njegovo ime in funkcija

OZNAKA PROTEINA	IME IN FUNKCIJA
APJ1	Šaperon z J-domeno (528 aminokislin)
ADH1	Alkohol dehidrogenaza (EC 1.1.1.1) (348 aminokislin)
SGT2	Majhni z glutaminom bogat protein2, ki vsebuje tetratricopeptidne ponovitve (angl. small glutamine-rich tetra-tricopeptid repeat-containing protein 2), košaperon, ki se veže s šaperonom Hsp70 (346 aminokislin)
STI1	Protein toplotnega šoka STI1; košaperon, ki se veže s Hsp70 (specifično SSA1 poddržino) in Hsp90 (589 aminokislin)
WTM1	Transkripcijski modulator WTM1; vloga pri regulaciji mejoze in utišanju transkripcije (437 aminokislin)
MGE1	Homolog proteina GrpE; mitohondrijski prekurzor, del PAM kompleksa ključnega za transport proteinov v mitohondrijski matriks (228 aminokislin)
SSE1	Protein toplotnega šoka SSE1 (poddružina Hsp70), ima od kalcija odvisno kalmodulin vezavno aktivnost (693 aminokislin)
HSP82	Protein toplotnega šoka 90kDa (Hsp90); inducibilno izražena izoforma (709 aminokislin)
SSC1	Protein toplotnega šoka SSC1 (poddružina Hsp70), mitohondrijski prekurzor (654 aminokislin)
PDC5	Piruvat dekarboksilaza izoencim 2 (EC 4.1.1.1) (563 aminokislin)
TDH1	Glicer-aldehid-3-fosfat dehidrogenaza 1 (EC 1.2.1.12) (332 aminokislin)
PFY1	Profilin, veže na aktin in vpliva na strukturo citoskeleta (126 aminokislin)
TIM44	Translokaza TIM44 (mitohondrijski prekurzor) (angl. import inner membrane translocase subunit) (431 aminokislin)
SUP35	Evkariontski sprostivitveni faktor peptidne verige (podenota, ki veže GTP) (angl. eukaryotic peptide chain release factor) (685 aminokislin)
AIP1	Z aktinom intergirajoči protein 1 (angl. actin-interacting protein 1), vključen v depolimerizacijo aktina (615 aminokislin)
MYO4	Miozin-4 (1471 aminokislin)
SAC6	Fimbrin, veže z aktinom in njegovimi strukturami (642 aminokislin)
SSQ1	Protein toplotnega šoka SSQ1 (poddružina Hsp70), mitohondrijski prekurzor (657 aminokislin)

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 PROTEIN TOPLITNEGA ŠOKA STI1 (KOŠAPERON)

Protein topotnega šoka Sti1 (Sti1 pri kvasovkah ali Hop1 pri človeku) je protein s 589 aminokislinami in molekulasko maso okrog 66 kDa (Preglednica 9). Sestavljen je iz dveh STI1 domen in vsebuje devet TPR ponovitev (tetra-trikopeptidnih ponovitev) (angl. *tetratricopeptide repeat*). TPR ponovitev je strukturni motiv 34 aminokislin, ki se običajno ponovi v tandemskem območju 3-16 motivov. Ob zvijanju proteina v sekundarno strukturo se motivi združijo v solenoidno TPR domeno (Punta in sod., 2007). Glede na TPR domeno sodi Sti1 protein v družino proteinov: Cdc 16, Cdc 23, Cdc 27 (kompleks proteinov, ki sprožijo anafazo ob mitotski delitvi celic), p67 podenota kompleksa NADPH oksidaze, imunofilini, ki se vežejo s Hsp90, transkripcijski faktorji, Pkr protein (angl. *protein kinase inhibitor*) Pex5 (angl. *major receptor for peroxisomal matrix protein import*) in nekateri mitohondrijski import proteini. Pripadajoč gen (*STI1*) ima pri kvasovki *S. cerevisiae* dolžino 1632 bp in je lociran na kromosomu 15, njegov ortolog pri človeku ima dolžino 2726 bp in je lociran na kromosому 11. Glavni postranslačijski oblici proteina sta glikozilirana (kot posledica N-glikozilacije) in fosforilirana oblika. Njegova glavna molekulska funkcija je ATPazna aktivnost (Bairoch in sod., 2005). Protein namreč vstopa v funkcijске interakcije z dvema ključnima proteinoma in njunimi izoformami: protein Hsp90 (angl. *Heat shock protein 90*) in Hsp70 (angl. *Heat shock protein 70*). Hsp90 protein je eden ključnih proteinov odgovoren za zvitje in aktivacijo nekaterih regulatornih proteinov (kinaza, steroidni hormonski receptorji in transkripcijski faktorji) in s tem odziv na vsako obliko stresa, ki denaturira protein. Obstaja v dveh izoformah: Hsp82- s topotnim stresom posredovana izoforma in Hsc82-konstitutivno izražena izoforma (Von Mering in sod., 2003). Protein Sti1 vstopa v interakcije z obema izoformama. Hsp90 je sestavljen iz štirih strukturnih podenot (Pearl in sod., 2000; Pearl in sod., 2001). N-terminalna domena, je visoko ohranjena domena z maso 25 kDa z visoko afiniteto do ATP in geldanamicina, zato je ključna domena za ATPazno aktivnost (Hidrolizo ATP do ADP). Zato so odgovorne aminokisline Leu34, Asn37, Asp79, Asn92, Lys98, Gly121, Phe124 in Glu33 (Stebbins in sod., 1997). Sledi srednja domena, ki je ključna za vezavo substrata (nežvitega proteina iz endoplazmatskega retikuluma ali denaturirana oblika). Srednjo in N-terminalno domeno povezuje polarni linker. C-terminalna domena pa deluje lahko tudi kot alternativno mesto vezave ATP, ključna pa je njena reakcija s t.i. košaperoni, kot so imunofilini in Sti1 (Pearl in sod., 2000; Pearl in sod., 2001; Stebbins in sod., 1997). Vsebuje namreč omenjen TPR prepoznavni motiv, preko katerega vstopa v direktne interakcije s proteinom Sti1. Hsp90 ima šaperonski cikel. Na začetku se nahaja v odprttem stanju z vezano ATP molekulo. V odprti konformaciji so izpostavljene hidrofobne regije z visoko afiniteto do nezvitih ali denaturiranih proteinov. Vezava substrata spremeni konformacijo proteina, kar vodi v hidrolizo ATP do ADP. Ob nastanku ADP se Hsp90 pretvorí v zaprto obliko z visoko afiniteto do ATP. Ob rekrutiranju nove molekule ATP se cikel ponovi (Li in sod., 2011). Sti1 je znan inhibitor ATPazne aktivnosti na N-terminalni regiji Hsp90. Vezan je na C-terminalno regijo. Ob začetku šaperonskega cikla se na kompleks veže Ppi-aza (prolil izomeraza). Intermediat je

nestabilen z entalpijskega vidika. Odcepi se Sti1, kar aktivira protein in poviša afiniteto do ATP. V nadaljnji fazi se zato vežeta protein p23 in ATP (poviša se afiniteta do substrata). Sledi hidroliza ATP in deaktivacija šaperona Hsp90. Interakcija proteina Sti1 s Hsp90 je druga pomembna molekulska funkcija.

Ugotovljeno je bilo, da protein Sti1 deluje kot stimulator ATPazne aktivnosti družine proteinov topotnega šoka Hsp70 (Wegele in sod., 2003). V Sti1 kompleks je vključenih 14 različnih Hsp70 proteinov, med njimi so najbolj izpostavljeni proteini Ssa (Ssa1, Ssa2, Ssa3 in Ssa4). Največjo afiniteto pa ima protein Sti1 do proteina Ssa1 družine Ssa (Wegele in sod., 2003). Poudariti velja, da človeški ortolog (Hop1 protein) igra obratno vlogo, torej zniža ATPazno aktivnost.

Poleg interakcije s Hsp90 in Hsp70 proteinoma in njunimi izoformami so znane interakcije Sti1 proteina s peptidil-prolil cis-trans izomerazo Cpr6, Hsp104, mitohondrijskim import proteinom Mas5 in Cdc 37 (košaperonom Hsp90).

Interakcije proteina Sti1 z ostalimi proteini, odgovornimi za odziv celice na stres (topotni in oksidativni) in za pravilno zvitje proteinov (šaperoni, košaperoni in imunofilini) poudarijo njegovo biološko vlogo pri posredovanju odziva na stres. Ker deluje kot inhibitor ATPazne aktivnosti pri Hsp90 proteinu, inhibira aktivnost družine proteinov Hsp90 v odzivu celice na stres. Znižano izražanje Sti1p proteina bi naj torej omogočilo reaktivacijo družine šaperonov Hsp90. Hkrati Sti1 deluje kot aktivator družine proteinov Hsp 70. Njegovo znižano izražanje naj bi inhibiralo aktivnost družine proteinov Hsp70 v odzivu celice na stres pri kvasovki *S. cerevisiae*. Pri človeku homologni Hop protein deluje ravno obratno (kot inhibitor ATPazne aktivnosti). V tem primeru bi ob znižanju izražanja Hop proteina prišlo do reaktivacije družine proteinov Hsp70. Tukaj se pojavi zanimivo vprašanje o soodvisnosti delovanja proteina Sti1, Hsp70 in Hsp90 (ali se omenjene molekule vedno nahajajo v kompleksu). Sti1 naj bi preko TPR domen neodvisno nadzoroval delovanje družine proteinov Hsp90 in Hsp 70. S Hsp70 naj bi se vezal preko domene TPR1, na Hsp90 pa preko domene TPR2a (Song in Masison, 2005). Najdeni pa so bili kompleksi Sti1p tudi z drugimi proteini brez Hsp90 in Hsp70. Vseeno pa je protein očitno nujno potreben za aktivnost Hsp 70 in Hsp 90. Sti1p namreč sodi med t.i. J-domenske košaperone (Mayer in Bukan, 2005). Omenjeni košaperoni so vključeni v vklapljanje molekule substrata (nezvit protein) na srednjo domeno v strukturi Hsp70 proteina. Hsp70 protein z vezanim ATP (na N-terminalni domeni iz dveh podenot I in II, vsaka z dvema nadalnjima podenotama A in B) ima visoko afiniteto za vezavo substrata. Vezava substrata poveča hitrost hidrolize ATP zgolj za 2-10 krat, kar je premalo. Zato so potrebni aktivatorji. Sti1 se v prvi fazi veže s substratom, nato preko N-terminalne domene interagira s Hsp70. S tem z entalpijskega stališča bistveno olajša mehanizem vezave substrata na osrednjo domeno Hsp70 proteina in hidrolizo ATP. Hidroliza nato sproži zapiranje strukture pokrova v Hsp70 proteinu (Mayer in Bukan, 2005). Interakcija s proteinom Hsp90 poteka po podobnem mehanizmu, le da je očitno interakcija med substratom in Hsp90 proteinom otežena ob vezavi s Hsp90.

Intaktni ekstrakt in ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta (modificiran ekstrakt) sta povzročila trikratno znižanje ravni proteina. Eden izmed vzrokov za to je lahko dejstvo, da

polifenoli delujejo kot njihov nadomestek in celici po enem ali večih specifičnih mehanizmih nudijo zaščito pred stresom. Njihova prisotnost v gojišču lahko sproži signalno transdukcijsko, ki vodi v direktno inhibiranje transkripcije proteinov toplotnega šoka (šaperonov in košaperonov). Energija je omejen vir v celici. Celica konstantno energijo preusmerja v sisteme, ki so v specifičnem časovnem intervalu potrebni za ohranjanje homeostaze. Lahko sta tudi direktno inhibirala izražanje Sti1 z vezavo na promotor, specifični transkripcijski faktor ali mRNA. Do znižanja ravni Sti1 proteina pa lahko pridemo tudi po drugih ključnih mehanizmih. Ekstrakta lahko delujeta tudi kot proantioksidanta (Vertuani in sod., 2004). Vertuani in sod. (2004) so definirali proantioksidante kot molekule, ki ne delujejo direktno, kot antioksidanti, ampak indirektno z modulacijo molekul ali regulacijo sinteze proteinov, vključenih v odziv na oksidativni stres in aktivirajo njihovo transkripcijo ali povišajo njihovo biodostopnost. Kot proantioksidanta sta lahko delovala po vsaj dveh mehanizmih. Prvi mehanizem je indirektna prehodna indukcija celici lastnega obrambnega odziva kot posledica nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti. Te sta lahko sprožila preko interakcij s kovinskimi ioni, kot je železov ion, ali z vplivom na metabolne encime. Ekstrakta bi lahko z vezavo na protein Sti1 vplivala tudi na njegovo lokalizacijo. V tem primeru bi za realno oceno vsebnosti Sti1 morali preveriti tudi citosolno in jedrno frakcijo celičnega ekstrakta.

Modificiran ekstrakt je še izdatno poudaril vpliv na raven proteina Sti1, saj elektroforetska lisa na gelu sploh ni bila zaznana (Preglednica 8). Očitno je bilo v tem primeru njegovo izražanje povsem inhibirano.

Ampak zaključek nekoliko težje ekstrapoliramo na človeka. Protein Sti1 je post-translacijsko glikoziliran. Ker imata človek in kvasovka *S. cerevisiae* drugačen profil glikozilacije, bi za potrditev, da imajo polifenoli enak vpliv tudi na protein toplotnega šoka pri človeku, morali poznati vpliv glikozilacije na hitrost ključnih metabolnih poti. Poleg tega ima protein Hop1 (ortolog proteina Sti1) sicer podobno primarno zaporedje, vendar obraten odziv (kot inhibitor ATPazne aktivnosti) v interakciji s družino proteinov Hsp70. V tem primeru bi morali za zaključek o vplivu polifenolov na toplotne proteine pri človeku poznati, kako drugačen tip interakcije med dvema proteinoma (Sti1 in Hsp70) vpliva na globalno interakcijsko mrežo.

## 5.2 PROTEIN TOPLITNEGA ŠOKA 70 kDa (Hsp70)

Hsp70 proteini predstavljajo družino ATPaz z molekulsko maso 70 kDa, ki se deli na številne poddružine (Preglednica 9) (Bairoch in sod., 2005). Kvasovka *S. cerevisiae* je evkariont s širokim spektrom Hsp70 poddružin oz. izoform, ki se med seboj razlikujejo po načinu procesiranja, sistemu izražanja in izoelektrični točki. Dve izmed njih sta Ssa in Ssb. Ssa se nadalje deli na razrede Ssa1, Ssa2, Ssa3 in Ssa4, ravnotako Ssb (Werner-Washburne in sod., 1987). Podrazreda Ssa in Ssb se razlikujeta predvsem po kinetičnih značilnostih (Lopez-Bueza in sod., 1998). Nahajajo se v citosolu, v plazemski membrani in v polisomih. Evkarionti na splošno izražajo več variacij Hsp70 proteinov: Hsc70 (konstitutivno izražena varianta), Hsp70 (inducibilno izražena varianta, ki se nahaja v oblikah Hspa1-8; Hspa1 obstaja še v variacijah Hspa1A, Hspa1B in Hspa1L), BiP ali Grp78 (angl. *binding immunoglobulin protein*), lokaliziran v endoplazemskem retikulumu in Grp75, lokaliziran v mitohondriju. Poddružina Ssa3 je lokalizirana v citosolu. Prokarioti pa izražajo samo tri oblike Hsp70 proteinov: DnaK, HscA in HscC. Pri kvasovkah se gen SSA3 nahaja na kromosому 2 in ima dolžino 1950 bp. Pri evkariontih geni HSPA1-8 nahajajo na kromosomu 6, njihove dolžine pa variirajo. Gen HSPA1A ima dolžino 2691 bp. Pri proteinih Hsp 70 najdemo tri domene. N-terminalna domena ima visoko afiniteto za ATP in je ključna domena za ATPazno aktivnost (hidrolizo do ADP). Sledi domena za vezavo substrata, ki ima visoko afiniteto za vezavo peptidov z izpostavljenimi hidrofobnimi regijami. C-terminalna domena ima TPR prepoznavni motiv za vezavo s košaperoni. Sekundarna struktura  $\alpha$ -heliksa se oblikuje v strukturo pokrovčka, ki se odpira in zapira. Protein Hsp70 deluje podobno kot protein Hsp90. Njegova glavna molekulsa funkcija je ATPazna aktivnost. V šaperonskem ciklu ob vezavi ATP je C-terminalna domena v odprttem stanju, kar izpostavi hidrofobne aminokisline Hsp70 proteina. Protein ima v fosforiliranem stanju visoko afiniteto za denaturirane (nezvite) peptide. Z vezavo peptida kot substrata se spremeni konformacija kompleksa, ki sproži hidrolizo ATP v ADP. Po hidrolizi ATP se na kompleks veže nukleotid izmenjalni faktor (angl. *nucleotide exchange factor*) (BAG-1), ki omogoči sproščanje ADP in vezavo nove molekule ATP. S tem se cikel ponovi. J-domenski košaperoni (DnaJ pri prokariontih oz. Ydj1p pri kvasovkah) delujejo kot stimulatorji hidrolize. S proteinom Hsp70 poddružine Ssa3 jih povezuje od Srp odvisna kotranslacijska pot (Becker in sod., 1996). Molekulsa funkcija Hsp70 družine je osnova za njihovo biološko funkcijo zaščite celic pred stresom s preprečevanjem agregacije proteinov in omogočanjem njihove renaturacije. Pri človeku pa so znane še druge funkcije. Kot del kompleksa Prp19 v spliceosomu namreč sodelujejo v procesu alternativnega izrezovanja mRNA. Kot inhibitor Jnk proteina v MAPK kinazni poti direktno inhibirajo apoptozo in omogočajo celično proliferacijo in diferenciacijo. Poleg interakcij Ssa3 z ostalimi izoformami (Ssa1, Ssa2 in Ssa4) vstopa v funkcionalne interakcije tudi s košaperoni Ydj1, Sti1, Mge1 in Apj (Kanehisa in Goto, 2000).

Aktivirani oblici Hsp70 in Hsp 90 proteina omogočata enakomerno zvitje peptidov (bodočih ključnih regulatornih proteinov) po prehodu skozi endoplazmatski retikel. Ker so regulatorni proteini nujno potrebni za regulacijo aktivnosti proteinov topotnega stresa, se pojavi vprašanje, ali se s proteinimi topotnega stresa soodvisno izražajo s pomočjo istih transkripcijskih regulatorjev. Regulatorni proteini (košaperoni) neposredno ali posredno vključeni v vse glavne

metabolne poti v kvasovki. Njihovo enakomerno izražanje tako pri višjih, kot pri nižjih temperaturah direktno vpliva na ohranjanje njihove koncentracije, s tem pa ohranjanje hitrosti metabolizma. Očitno polifenoli vplivajo na ohranjanje enakomerne hitrosti metabolizma tudi v fazi stresa.

Naši rezultati nakazujejo, da se v primeru poddružine Ssa3 raven proteina pri izpostavitvi intaktnemu ekstraktu praktično ni spremenila oz. le rahlo povišala, pri izpostavitvi modificiranemu ekstraktu pa trikrat znižala (Preglednica 8). Tako, kot v primeru proteina St1, lahko tudi v primeru Hsp70 poddružine Ssa3 argumentiramo, da zaščita s strani Hsp70 proteina ni bila potrebna, saj neko obliko zaščite pred stresom nudijo že polifenoli. Zato je celica energijo usmerila v vzdrževanje drugih homeostaz. Ekstrakt je lahko deloval kot antioksidant oz. molekula visokim reduksijskim potencialom, reduciral reaktivne kisikove zvrsti in sprožil signalno transdukcijo, ki je vodila v inhibicijo sinteze proteine Ssa3. Lahko se je direktno vezal na promotor in inhibiral izražanje (Tran in sod., 2010). Možna je tudi vezava na specifični transkripcijski faktor (vpliv na nivoju transkripcije) ali mRNA (vpliv na nivoju translacije). Druga možnost pa je, da je ekstrakt deloval kot proantioksidant. Lahko preko kovinskih ionov ali z vplivom na metabolne encime sproži nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti in s tem signalno kaskado, ki vodi v povišano raven izražanja Ssa3 proteinov. Lahko pa je z direktno vezavo na promotor (mRNA ali specifični transkripcijski faktor) aktiviral izražanje Ssa3. Vendar je sistem povezan z negativno povratno zanko. V določenem času od takrat, ko se polifenoli porabijo, se raven izražanja proteina ponovno zniža, saj je stres odpravljen in zanje ni več potrebe.

Bioaktivne komponente v ekstraktu so lahko interagirale tudi s proteinom in vplivale na lokalizacijo proteina v citosolu, mitohondrijih in jedru.

Znižanje ravni Hsp70 proteinov poddružine Ssa3 lahko pomeni hkrati tudi nekoliko nižjo raven zaščite pred nadaljnjjim stresom. Da inhibicija izražanja Hsp70 (in tudi Hsp90) družine proteinov pomeni povečano občutljivost celice na stres, so potrdili tudi Tran in sod. (2010). V njihovi raziskavi je epigalokatehin-3-galat, najbolj zastopan polifenol v zelenem čaju, inhibiral izražanje Hsp70 in Hsp90 proteinov v MCF-7 liniji rakavih celic z inhibicijo aktivnosti njihovih promotorjev (Tran in sod., 2010). Po njihovih rezultatih lahko sklepamo, da je polifenol s tem izkazal antikancerogeno delovanje in aplikativnost pri kemoterapiji. Ampak zaščita je lahko enkratna. Ko se molekule polifenolov prabijo (konjugirajo, oksidirajo ali reducirajo), niso več biodostopne. Pri rakavih celicah bi tako ob aplikaciji polifenolov, v dobi, ko je celica bolj občutljiva na stress, izvedli kemoterapijo in na ta način uničili tumor. Vendar bi dostava morala biti ciljana, saj na stres postanejo bolj občutljive tudi zdrave celice. Če deluje ekstrakt kot antioksidant, bi morali celici dovajati antioksidante v določenem času po delovanju stresnega dejavnika (kot je sport), če bi želeli izkoristiti aplikacijo polifenolov kot prehransko dopolnilo. Tako bi raven Hsp70 (in tudi Hsp90) hitreje uravnali na normalno fiziološko vrednost.

Ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta je izkazal večji vpliv na raven Ssa3 poddružine. Vendar moramo vzeti v obzir raven izražanja vseh poddružin Hsp70 proteinov.

Ekstrakta namreč lahko vplivata na koncentracijsko razmerje med posameznimi člani s družine Hsp70.

Za nas so bili zato še posebej zanimivi rezultati Hsp70 proteina poddružine Ssa1. V primeru modificiranega ekstrakta smo zaznali kar devetkrat povišano raven proteina, medtem ko pri intaktnem ekstraktu protein ni bil zaznan. Tudi tu lahko argumentiramo, da ekstrakta lahko delujejo kot lovilca prostih radikalov. Večina molekul v ekstraktu je namreč lahko v reducirani obliki z visokim redoks potencialom, zato reaktivne kisikove zvrsti reducirajo. To bi pomenilo, da nadomeščajo celici lastni proteinski aparat za zmanjšanje reaktivnih kisikovih zvrsti. Vendar bi od celice v tem primeru pričakovali znižanje ravni proteinov, vključenih v odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti, kot so katalaza, superoksid dismutaza, peroksidaza, idr. Lahko pa delujejo kot proantioksidanti (in povišana koncentracija Ssa1 nakazuje na večjo verjetnost slednjega). V tem primeru, bi se večina molekul v ekstraktu nahajala v oksidirani obliki. Posegli bi v redoks homeostazo in sprožili nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti. S tem bi inducirali lastni obrambni sistem. V tem primeru bi pričakovali povišano izražanje proteinov topotnega šoka in košaperonov. Skupina Lee in sod. (2006) je poročala o povišanju ravni Hsp proteinov v *Chironomus tentans* ob izpostavitvi fenolnim spojinam (nonifenol, bisfenol-A, endosulfan, kloropirifos, ogljikov tetraklorid) kot polutantom. Polifenoli, kot podskupina fenolnih spojin imajo lahko podoben mehanizem delovanja (Lee in sod., 2001). Koncentracija reaktivnih kisikovih zvrsti doseže vrh tik preden se inducira izražanje lastnega celičnega obrambnega sistema. Zato tudi proteini topotnega šoka v določenem časovnem intervalu po začetku delovanja stresnega dejavnika dosežejo koncentracijski vrh. Vsaka poddružina proteinov topotnega šoka lahko doseže vrh v različnem času od začetka delovanja stresnega dejavnika. Poddružina Ssa1 ima lahko najdaljši odzivni čas. Zato bi bilo potrebno časovno odvisno spremljanje koncentracije. Problem bi lahko rešili z mikromrežami. Kot lovke bi nanesli protitelesa proti proteinom topotnega šoka. Kot vzorec bi uporabili celične frakcije v različnih časovnih obdobjih po začetku delovanja stresnega dejavnika.

Ker je celokupen vpliv ekstrakta vstota vplivov, ki nastanejo zaradi interakcij med vsemi bioaktivnimi učinkovinami v ekstraktu, je moralo med modifikacijo ekstrakta v prebavnem traktu priti do neke spremembe v interakcijski mreži, ki je pomembno vplivala na raven proteinov Hsp70 družine. V primeru proteina Ssb1 smo v primeru intaktnega ekstrakta zaznali rahlo znižanje izražanja (1,5-kratno). Iz rezultatov lahko vidimo, da se je raven družine Hsp70 proteinov v splošnem znižala (razen proteinov Hsp70 poddružine Ssa1). Spremenilo se je koncentracijsko razmerje med proteini, pri čemer je izrazito prevladoval razred Ssa1. Najverjetnejša razloga glede na vse predhodno naštete bi zato bila, da sta ekstrakta (v primeru, da delujejo kot proantioksidanta) aktivirala transkripcijske faktorje, ki uravnavajo izražanje razreda Ssa1 Hsp70 proteinov, ostali podrazredi Hsp70 pa so bili nekako utišani, saj z manjšo afiniteto reagirajo s košaperoni (dokazano je bilo za košaperon St1p). Zato delujejo bolj kot rezervni sistem in so manj potrebni.

Upoštevati moramo tudi, da smo analizirali zgolj mitohondrijsko frakcijo proteinov. Za realno oceno ravni vsakega od proteinov na elektroforetski lisi bi morali upoštevati tudi vzorce citosolne in jedrne frakcije. Tudi v tem primeru pa moramo biti pazljivi pri prenosu vpliva

ekstrakta na raven izražanja človeške družine Hsp70. Polifenoli, kot glavna komponenta ekstrakta, na raven izraženega proteina vplivajo bodisi na nivoju transkripcije z vezavo na specifične transkripcijske faktorje ali promotorje, lahko pa tudi na nivoju translacije z interakcijo z mRNA. V prvem primeru bi na interakcijo s polifenoli lahko imele vpliv potranslacijske modifikacije, v drugem primeru pa epigenetske modifikacije mRNA. Lahko pa se vežejo direktno na tarčne proteine ali tarčne protein modificirajo (reducirajo, oksidirajo). Tudi v tem primeru je mehanizem funkcionalne interakcije odvisen od post-translacijskih modifikacij. Tudi posledice interakcije so lahko različne. Ena izmed njih je spremembra v lokalizaciji tarčnih proteinov. Dokazano je že bilo, da fitoleksini, ki izvirajo iz rastlinskih tkiv vplivajo na lokalizacijo aktina, tubulina in šaperonov v celicah organizma (Porschewski in sod., 2001). Da bi videli odvisnost med delovanjem ekstrakta in post-translacijskimi modifikacijami, bi morali poznati in primerjati profil potranslacijskih modifikacij transkripcijskih faktorjev in epigenetskih modifikacij mRNA pri *S. cerevisiae*, da bi lahko zaključili, ali bo vpliv enak na izražanje človeške Hsp70 družine.

### 5.3 TRANSKRIPCIJSKI MODULATOR WTM 1

Transkripcijski modulator Wtm1 je 437 aminokislin dolg transkripcijski faktor, katerega glavna molekulska funkcija je transkripcijska korepresijska aktivnost (Preglednica 9) (Bairoch in sod., 2005). Aktivnost mu omogoča WD40 domena, ki je sestavljena iz specifičnega strukturnega motiva 40 aminokislin, ki se običajno končajo z dipeptidom triptofan-aspartat. Tandemske ponovitve dipeptida se zvijejo v solenoidno obliko,  $\beta$ -sodček, specifičen za funkcije signalne transdukcije, transkripcijske regulacije, kontrole celičnega cikla, avtofagije in apoptoze (Punta in sod., 2007). Protein ima dve ključni vlogi. Prva vloga je vpliv na redoks stanje deoksiribonukleotida, ki je ključnega pomena za sintezo in obnovo DNA. Za njegovo redoks stanje skrbi encim ribonukleotid reduktaza (RNR-reduktaza) (ribonukleotid pretvori v deoksiribonukleotid). Encim katalizira reakcijo redukcije ribonukleotidov v deoksiribonukleotide. (Zhang in sod., 2006). Sestavljen je iz velike podenote R<sub>1</sub> in majhne podenote R<sub>2</sub> v obliki  $\beta$ -sodčka ( $\beta\beta'$ ), heterodimera Rnr2/Rnr4. Velika podenota je locirana v ocitoplazmi, majhna podenota pa v jedru. Velika podenota je odgovorna za vezavo substrata (NTP) in alosteričnih efektorjev. Majhna podenota vsebuje di-železov tirozilni radikal, ki deluje kot kofaktor pri redukciji. Sistem je reguliran preko dveh mehanizmov: poškodba DNA molekule in raven železa v celici (Delgado, 2012). Ob poškodbi DNA molekule se majhna podenota premesti iz jedra v citoplazmo (kjer se nahaja substrat in vrši reakcija redukcije), kjer se preko fizičnih interakcij združi z veliko podenoto in opravi funkcijo (Zhang in sod., 2006). Ko je železa v celici dovolj, je na razpolago kot kofaktor in encim lahko opravlja funkcijo. V tem primeru ne bo potrebe po faktorju Wtm1, ki bo majhno podenoto kot sidro držal v jedru, zato se bo njegova raven znižala. Raven Wtm1 je regulirana na nivoju translacije. Ko ni potrebe po proteinu se nanj namreč vežeta proteina Cth1 in Cth2. mRNA se posledično razgradi. Ob pomanjkanju železa (tudi če so prisotne poškodbe DNA molekule), ni razpolago dovolj kofaktorja, da bi encim lahko opravljal svojo funkcijo, zato se majhna podenota obdrži v jedu. Da se to zgodi se mora raven Wtm1 proteina povišati, da lahko deluje kot sidro in kompleks obdrži v jedru (Zhang in sod., 2006; Lee in Elledge, 2006). Ko se encim opravi svojo funkcijo, se mora vrniti v jedro. Zato je potreben protein Kap122. Vendar ne

potekajo direktne interakcije med Kap122 in ribonukleotid reduktazo (Zhang in sod., 2006). Zato protein Wtm1 deluje kot adapter, ki omogoča proteinu Kap122 prenos heterodimera Rnr2/Rnr4 nazaj v jedro po opravljeni funkciji. Protein Wtm1 se namreč tudi premešča med jedrom in citoplazmo (Zhang in sod., 2006). Druga vloga Wtm1p je v reguliranju celične delitve. Gre namreč za novo družino transkripcijskih modulatorjev z dvema homologoma Wtm2p in Wtm3p. Mutacije genov omenjenih proteinov derepresira gen IME2 (ki je neaktiviven v haploidnih celicah). Deluje namreč kot represor lokusov, odgovornih za redukcijsko delitev v haploidnih celicah. Hkrati aktivira HMR lokus pri *S. cerevisiae*, saj negativno regulira utišanje kromatina (Plemberton in Blobel, 1997).

Analiza 2-D je pokazala trend znižanja ravnih izražanja pri obeh ekstraktih- nekoliko večjo pri ekstraktu po prehodu skozi model prebavnega trakta (Preglednica 8). Tukaj lahko polifenoli delujejo kot antioksidanti in z redoks reakcijami povečajo biodostopnost železa za RNR-reduktazo. Sklepamo namreč, da mora biti v reducirani obliki za delovanje encima. V tem primeru povečajo raven kofaktorja, ki je na razpolago za redukcijo ribonukleotidov. Zato Wtm1 ni več potreben kot sidro in se njegova raven zniža, RNR-reduktaza pa premesti v citoplazmo. Ob presežku železa se aktivirata Cth1 in Cth2, ki interagirata z mRNA proteina Wtm1 in sprožita njen razgradnjo (Delgado, 2012). Kot antioksidanti so lahko nudili neko obliko zaščite celici. S tem RNR-reduktaza ni bila potrebna, velik delež protein pa je ostal v jedru vezan v kompleks s heterodimerom.

Kot rečeno pa lahko delujejo tudi kot proantioksidanti. Lahko aktivirajo nastajanje reaktivnih kisikovih zvrst, s tem pa inducirajo lastni obrambni mehanizem. Z indukcijo reaktivnih kisikovih zvrst so se lahko kopičile poškodbe DNA. Vendar se tukaj pojavi vprašanje, kako inducirajo nastanek reaktivnih kisikovih zvrst. Ena možnost je preko direktne oksidacije molekul. Z indukcijo nastanka reaktivnih kisikovih zvrst je lahko nastalo več poškodb na DNA molekuli. Posledično se pojavi povečana potreba po RNR-reduktazi, povečana prememstitev v citoplazmo in znižana raven Wtm1 proteina.

Zanimivo je dejstvo, da smo protein sploh zasledili v mitohondriju glede na to, da gre za jedrni protein. Najverjetnejša razloga za to bi se skrivala v mehanizmu, ki ga mitohondriji uporabijo za obnovo poškodb DNA. Ob povečani koncentraciji reaktivnih kisikovih zvrst se tudi poveča raven poškodb na mitohondrijski DNA. Wtm1 protein se lahko lokalizira v mitohondrij, kjer sodeluje pri obnovi mtDNA.

Tukaj moramo takoj tudi argumentirati, da smo operirali zgolj z mitohondrijsko frakcijo proteinov. Rezultat, ki se nam prikazuje kot zmanjšana raven, lahko pomeni zgolj spremembo v lokalizaciji proteina, ki jo povzroči interakcija z estraktoma. Polifenoli lahko izkažejo svoj vpliv tudi tako, da se direktno vežejo na protein in bodisi vplivajo na post-translacijske modifikacije proteina (preprečijo ali omogočijo fosforilacijo, metilacijo, acetilacijo, idr.). Da bi razmišljjanje lahko potrdili bi bili potrebni dve analizi. V prvi analizi bi morali izvesti še 2-D elektroforezo citosolne in jedrne frakcije. Rezultat intenzitete elektroforetskih lis v vseh treh frakcijah v primerjavi s kontrolo bi nam podal šele jasno oceno o povečanju ali zmanjšanju vsebnosti proteina. Da bi dokazali vezavo polifenolov na protein, pa bi morali izvesti analizo, v kateri bi bilo razvidno, s katerimi proteini polifenoli reagirajo. Možnosti imamo več. Med

njimi so mikromreže, v kateri so kot lovke proteini (posamezen protein bi lahko bil nanešen v vrsticah), na mikromreži pa nanesemo označen fluorescenčno označen vzorec ekstrakta (ekstrakt pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta bi bil s Cy3, ozadje ekstrakta pa kot referenčni vzorec s Cy5 barvilom- pripravili bi namreč dve ločeni mikromreži). Druga možnost bi bila izolacija proteinov skupaj z vezanimi metaboliti (polifenoli). Sledila bi metanolna ekstrakcija metabolitov in identifikacija protez masno spektrometrijo. Tretja možnost bi bila analiza z mikropretočnimi sistemi, kjer bo celično vsebino najprej ločili na frakcije, nato bi v vsaki od frakcij ločili protein med seboj.

#### 5.4 F<sub>1</sub>-ATPaza β PODENOTA

F<sub>1</sub>-ATPaza (EC 3.6.3.14) je mitohondrijski membranski protein, ki je sestavljen iz dveh sektorjev: F<sub>1</sub> sektor (v mitohondrijskem matriksu) in membranski F<sub>0</sub> sektor (Preglednica 9). F<sub>1</sub> sektor je sestavljen iz treh α in treh β podenot (Chang in sod., 2009). Preko δ, ε, κ in β podenote je povezana z membranskim sektorjem, ki vsebuje a in c podenoto (Kanehisa in Goto, 2000). C podenota predstavlja sodček, ki prečrpa 3 H<sup>+</sup> protone za sintezo ene ATP molekule po principu rotacije. Je glavni protein elektronske transportne verige, ki se nahaja tako na mitohondrijski membrani kot na membrani tilakoid v kloroplastu. Deluje kot H<sup>+</sup> transporter, ki se na mitohondrijski membrani nahaja kot kompleks V. NADH-dehidrogenaza prečrpa 4 H<sup>+</sup> protone ob prenosu 2 elektronov na ubikinon. Elektrona se preneseta tudi od encima FADH-dehidrogenaze, pri čemer se sukcinat oksidira v fumarat. Ubikinon nato prenese elektron na citokrom bc<sub>1</sub> kompleks, ki je slabši reducent kot ubikinon. Pri tem se prečrpata dva vodikova protona (Kanehisa in Goto, 2000). Elektron se nato prenese preko citokroma c na citokrom c oksidazo, kjer se ponovno prečrpata dva H<sup>+</sup> protona na citoplazemski sektor. Nato se porabi za redukcijo molekule kisika, vodikove protone pa prečrpa F<sub>1</sub>-ATPaza.

Rezultati nakazujejo na 1,5x znižanje ravni proteina ob dodatku modificiranega ekstrakta v primerjavi z ozadjem, kar je lahko posledica povišanega redukcijskega stanja celice (povišano razmerje NADH+H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>) v celici zaradi prisotnosti polifenolov kot reducentov, kar sproži potrebo po povišanem izražanju proteina. V tem primeru gre za protein, ki je ohranjen celo med kraljestvi, zato bi sklepali, da lahko enak odziv pričakujemo tudi pri človeku. Podobno so Cigut in sod. (2011) ob tretiraju kulture *Saccharomyces cerevisiae* s polifenoli bogatim ekstraktom propolisa dobili znižano raven F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintaze. Do podobnih rezultatov je prišla ekipa Zhang in sod. (2009) ob testiranju resveratrola na podganah. Vzorci so izvirali iz mitohondrijske frakcije možganov in jeter podgan (Zhang in sod., 2009). Rezultate lahko podpre tudi Han in sod (2007) ob izpostavitvi podgan kukurminu in pridobivanju vzorcev iz možganov (Han in sod., 2007). Ker pri vplivu čiste snovi (polifenola) ni vključenih morebitnih interakcij med ostalimi bioaktivnimi komponentami, je primerjava vpliva med ekstrakti in čistimi snovmi težja.

Polifenoli so lahko vplivali na raven encima bodisi z direktno interakcijo s promotorjem, specifičnim transkripcijskim faktorjem ali mRNA.

## 5.5 PEPTIDIL/PROLIL-CIS/TRANS IZOMERAZA CPR6 (CIKLOFILIN)

Peptidil/prolil-cis/trans izomeraza (rotamaza) (EC 5.3.8.1) sudi v D poddružino ciklofilinov (imunofilini), 40 kDa proteinov z značilno PPIazno ciklofilinsko domeno in tremi TPR domenami (Preglednica 9) (Bairoch in sod., 2005). PPIazna domena vsebuje 109 značilnih aminokislin, ki so odgovorne za pretvorbo prolina, vezanega na peptid iz *trans* v bolj stabilno *cis* obliko (Punta in sod., 2007). Pri kvasovkah sta bili identificirani dve prolil-peptidil izomerazi: Cpr6 in Cpr7. PPIazna domena skupaj s TPR domeno narekuje njeno molekulsko funkcijo (Bairoch in sod., 2005). Preko TPR domene peptidil-prolil cis/trans izomeraze vstopijo v interakcije s Hsp90 proteinom oz. njegovimi izoformami, kjer delujejo kot košaperoni, s tem pa prispevajo k funkciji odziva na oksidativni in temperaturni stres, v katerih pride do denaturacije proteinov (Mayr in sod., 2000). Človeški gen in gen kvasovke *S. cerevisiae* imata podobno dolžino (človeški gen ima 1113 bp in se nahaja na kromosому 4, gen kvasovke pa ima 1116 bp in se nahaja na kromosому 7). Poleg interakcije s Hsp 90 proteinom (Hsp82 in Hsc82 izoformama) vstopa peptidil/prolil-cis/trans izomeraza v interakcije z že omenjenim Sti1 proteinom in košaperoni Ahal in Sba1. Poleg tega interagira s proteinom Hsp104, proteinom Sis1, odgovornim za jedrno migracijo med mitozo, Pbp1 (angl. *PAB1-binding protein*), odgovornim za pravilno poliadenilacijo mRNA, Sgt2 protein (angl. *Small glutamine-rich tetra-tricopeptide repeat containing protein 2*) in proteinom Btn2, ki uravnava hitrost prevzema arginina v celici (Mayr in sod., 2000).

V rezultatih je vidna sprememba v ravni proteina pri ekstraktu po prehodu skozi model prebavnega trakta, in sicer znižan nivo (Preglednica 8). Ekstrakt lahko deluje kot nadomestek za celico lastni obrambni sistem. Zato celica preusmeri energijo v homeostazo drugih metabolnih produktov, ki so v tistem trenutku potrebni. Polifenoli so lahko tudi v tem primeru delovali na ravni transkripcije, pri kateri so se vezali na mRNA, ki pripada proteinu in bodisi vplivali na njeno alternativno izrezovanje ali druge epigenetske modifikacije. Alternativno izrezovanje in epigenetske modifikacije so lahko spremenile sekundarno strukturo mRNA, pri čemer se je znižala raven translacije. Lahko so vstopili v interakcije s specifičnim transkripcijskim faktorjem, ga reducirali in deaktivirali. Lahko so se tudi vezali na protein. Vezava na protein je lahko rezultirala v premeščanju proteina iz mitohondrijev v citoplazmo ali jedro. Tudi v tem primeru bi morali analizirati intenziteto lis na gelih citosolne in jedrne frakcije in raziskati funkcionalne interakcije proteina s polifenoli.

Ekstrakt je lahko deloval tudi kot proantioksidant in s povišanjem koncentracije reaktivnih kisikovih zvrsti, bodisi preko oksidacije kovinskih ionov ali direktnje oksidacije molekul, induciral lastni obrambni sistem. Lahko pa je z vezavo na specifične transkripcijske faktorje, promotor ali mRNA vplival na povišano raven proteina. Po določenem času je bila njegova funkcija opravljena (v manj kot dveh urah od tretiranja), zato smo zaznali že znižano raven skozi sistem negativne povratne zanke.

Ciklofilini so na splošno visoko ohranjena skupina proteinov od *E. coli* do človeka. Znano je njihovo povečano izražanje (zlasti proteina CypA) pri raku, kot je hepatocelularni karcinom, rak na pljučih, na trebušni slinavki na črevesju, melanoma in glioblastoma multiforme (Lee in

Kim, 2010). Glede na to, da je modificiran ekstrakt v naši raziskavi znižal raven proteina iz skupine ciklofilinov in glede na visoko ohranjenost proteinov, bi lahko ekstraktu pripisali tudi antikancerogeno delovanje.

## 5.6 AKTIN

Aktin je multifunkcionalen protein z molekulsko maso 42 kDa, ki ima eno najpomembnejših vlog pri celični rasti in razmnoževanju (Preglednica 9) (Bairoch in sod., 2005). Gen za aktin je visoko ohranjen med vrstami. Tako pri kvasovkah kot pri višjih evkariontih ima dolžino 1128 bp. Pri kvasovkah se gen *ACT1* nahaja na kromosому šest (Maglot in sod., 2007). Obstaja več tipov aktina, ki jih kodira genska družina 60 elementov, genov in psevdogenov. Višji evkarionti, kot je človek, imajo okoli 30 genov in psevdogenov, ki kodirajo zapis za aktin. Glavni razredi so:  $\alpha$ -,  $\beta$ - (gen *ACTB*) in  $\gamma$ - aktin, ki kodira  $\gamma_1$  (gen (*ACTG1*) in  $\gamma_2$  (*ACTG2*) podrazreda.  $\gamma_2$  podrazred najdemo v gladkih mišičnih celicah,  $\alpha$  v skeletnih mišičnih celicah,  $\beta$  podrazred pa je značilen za ostale celične tipe. Aktin je sestavljen iz 375 aminokislin, ki so razdeljene v dve domeni (Bairoch in sod., 2005). N-terminalna domena vsebuje kisle aminokislinske ostanke in se začne z aspartatom, ki je acetiliran. C-terminalna domena vsebuje bazične aminokislinske ostanke in se konča z dipeptidom fenilalanin-cistein. Primarno zaporedje aminokislin se zvije v dvodelno globulo z vmesno sponko. Struktura je specializirana za katalizo reakcije vezave in hidrolize ATP molekule, njegovo glavno molekulsko funkcijo.

Protein je eden najbolj zastopanih v evkarionskih celicah in ima širok spekter bioloških funkcij. Ena izmed njih je acetilacija histonov. Aktin se kot strukturni element nahaja v molekuli Act3/Act4 (angl. *actin-like protein*), ki je podenota H/H2A-histonske acetiltransferaze Nu4. Kot acetiltransferaza je vključena v acetilacijo histona H4. Preko sistema acetilacije je vključena v dva ključna procesa: regulacija transkripcije preko pretvorbe med strukturama heterokromatin in evkromatin in sistem obnove poškodovane DNA molekule. Ko aktin v podenoti acetiltransferaze sprejme molekulo ATP, postane Nu4 fosforilirana. S tem se deaktivira in raven acetilacije histona H4 se zmanjša (Utley in sod., 2005). S tem se omogoči pretvorba v aktivno obliko evkromatina, aktivira se lahko transkripcija ali sistem obnove DNA. Ker je eden izmed vzrokov za poškodbo DNA oksidativni stres, lahko s tem potrdimo vlogo aktina v posredovanju odziva na oksidativni stres.

Druga glavna biološka funkcija aktina je strukturna. Aktin se namreč lahko nahaja bodisi v prosti (G-aktin) ali fibrilarni (F-aktin) obliki. V fibrilarni obliki predstavlja glavni strukturni element mikrofibrilov kot del citoskeleta (Pruyne in sod., 2000). Citoskelet predstavlja strukturno osnovo polariziranosti celice v različnih fazah rasti, ob mitotski in ob mejotski delitvi. Ravno polarizirano območje aktinskih filamentov predstavlja primarno strukturno determinanto polarnosti celice. Mikrofibrili celice hkrati prispevajo k transport eksocitotskih veziklov, endocitotskih veziklov, mitohondrijev in vakuol pri kvasovki. Hkrati pripevajo k potovanju kromosomov v mejotski in mitotski delitvi celic (Munn in sod., 1995). Pri višjih

evkariontih so aktinski filamenti glavni strukturni element mišičnih celic, saj z vezavo ATP molekule sodelujejo pri potovanju miozinskih filamentov.

Aktin pri mejotski delitvi ne sodeluje zgolj v smislu transporta tetrad, temveč tudi v telofazi prve in druge mejotske delitve pri ločevanju brstov od hčerinske celice. V *S. cerevisiae* sta hčerinska in materiska celica med seboj povezani z ozkim grlom, ki se v pozni anafazi začne zapirati (Bi in sod., 1998). Obroč v pozni anafazi najprej vsebuje zgolj Myo1p protein (miozin), na katerega se veže F-aktin in obroč se prične krčiti. Z depolimerizacijo aktina se struktura začne krčiti.

Aktin vstopa v številne funkcionalne interakcije. Poleg tega, da se nahaja kot del Nu4 kompleksa, predstavlja tudi del Ino80 kompleksa (Shen in sod., 2000) z Ino80 ATPazo, ki preko helikazne aktivnosti sodeluje pri remodeliranju DNA in Swi/Snf kompleksa, ki sodeluje pri razmikanju histonov v fazi aktivacije transkripcije. Znane so tudi interakcije s Hsp90 proteinom, s prolinom bogatim proteinom Las17 (LasH), z adenilil ciklazo povezanim proteinom (ang. *adenylyl-cyclase associated protein*) Srv2, helikazo Swr1, groL šaperoninom in  $\alpha$ -podenoto T-kompleksu proteina 1.

Glede na biološko funkcijo aktina pri reguliranju celičnega cikla in odziva na oksidativni stres bi pričakovali povečano izražanje ob tretiranju kvasovk tako z ekstraktom pred prehodom skozi model prebavnega trakta, kot z ekstraktom po prehodu skozi model prebavnega trakta. Rezultati se ujemajo z našo domnevo (Preglednica 8). Ob izpostavitvi ekstraktu pred prehodom skozi model prebavnega trakta se je izražanje aktina 1,5 krat povečalo, ob izpostavitvi ekstraktu po prehodu skozi model prebavnega trakta pa celo trikrat povečalo. Aktin je ena najpomembnejših strukturnih in funkcionalnih enot v celici. Poleg tega, da preko acetilacije histonov vpliva na splošno raven transkripcije v celici, je glavna gradbena enota citoskeleta in niti delitvenega vretena. V celici povzroča nekakšno molekularno gnečo (Olivera-Araiza in sod., 2012). Z ustvarjanjem nekakšne molekularne gneče lokacijsko približajo encimske komplekse z njihovimi substrati in na ta način stabilizira metabolizem, med njimi tudi glikolitični metabolizem in metabolizem v elektronski transportni verigi. Hkrati z reguliranjem acetilacije histonov aktin vpliva na raven transkripcije encimov. Glede na to, da sta s polifenoli bogata ekstrakta znižala raven nekaterih šaperonov in košaperonov je lahko celica preusmerila energijo v ohranjanje enakomernega in intenzivnejšega metabolizma. Zato je povečanje ravni transkripcije aktina smiselno.

Modificiran ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta večji vpliv, kot nemodificiran ekstrakt. Očitno je modifikacija ekstrakta privedla bodisi do povečane biodostopnosti biaktivnih učinkovin za celico. Tudi tu je lahko za povečanje odgovorna interakcija polifenolov bodisi s promotorjem, mRNA za aktin, s specifičnimi transkripcijskimi faktorji za aktivacijo transkripcije, ali direktno z aktinom. Prejšnje raziskave na aktinu so pokazale, da različni polifenoli različno vplivajo na aktin (Santos-Buelga in sod., 2010). Pri večini je viden direkten vpliv na njegovo polimerizacijo. Aktin naj bi bil pomembna tarča flavonoidov. Med njimi kemperol, kot predstavnik flavonolov močno inhibira polimerizacijo. Pri kvercetinu so beležili šibko inhibicijo. Epigalokatehin na drugi strani polimerizacijo stimulira (Santos-Buelga in sod., 2010). V mislih moramo imeti, da imamo opravek z ekstraktom, raziskave pa

so bile narejene na posameznih polifenolih. Ker medsebojne interakcije polifenolov in ostalih bioaktivnih učinkovin niso bile upoštevane, je vzporednico težje potegniti.

Za potrditev razlage bi morali raziskati interakcije med polifenoli in proteini (z mikromrežami ali masno spektrimetrijo) in interakcije med vsemi bioaktivnimi učinkovinami v ekstraktu. Lahko pa bi tudi raziskali interakcije med polifenoli in mRNA (z mikromrežami ali masno spektrometrijo). Koncentracija aktina v mitohondrijski frakciji ne odraža celokupne koncentracije aktina v celici. Za realno oceno ravni aktina v celici bi morali upoštevati tudi vsebnost v citosolni in jedrni frakciji.

### 5.7 FRUKTOZA-BIFOSFAT ALDOLAZA

Fruktoza-bifosfat aldolaza (Fba1) (EC 4.1.2.13) organizma *S. cerevisiae* je 359 aminokislin dolga aldehid liaza molekulske mase okrog 40 kDa (Preglednica 9) (Bairoch in sod., 2005). Gen za encim se pri kvasovki nahaja na kromosому 11 in je dolg 1080 baznih parov. Primarni peptid se zvije v terciarno strukturo z dvema podenotama. Vsaka podenota ima osem  $\alpha$ -heliksov in osem  $\beta$ -prepognjenih listov zvitih v strukturo TIM sodčka (Punta in sod., 2007). Je encim, ki sodeluje v treh ključnih procesih v celici: glikoliza, glukoneogeneza in kalvinov cikel. V procesu glikolize sodeluje z encimom fosfoglukoizomerazo, ki glukozo-6-fosfat pretvori v fruktozo-6-fosfat in fosfofruktokinazo, ki fruktozo-6-fosfat pretvori v fruktozo-1,6-bifosfat. Fruktoza-bifosfat aldolaza nato fruktozo-1,6-bifosfat pretvori v gliceraldehid-3-fosfat in dihidroksiaceton fosfat po mehanizmu tvorbe Sciffovih baz s polarizirano karboksilno skupino. Glede na to obstajata dva razreda aldolaz (Chang in sod., 2009). Razred I v strukturi vsebuje visoko ohranjeno aminokislino lizin, ki polarizirajo karboksilno skupino fruktoze-1,6-bifosfata. Gliceraldehid-3-fosfat se nato odcepi, ko visoko ohranjena bazična aminokislina sprejme elektron Schiffove baze. Razred II namesto lizina uporabi dvovalentni  $Zn^{2+}$  ion (Punta in sod., 2007). Aldolaza lahko katalizira nastanek dihidroksiacetonfosfata tudi iz fruktoze-1-fosfata in sedoheptuloze-1,7-bifosfata (pri tem se odcepi eritroza-4-fosfat). V procesu glukoneogeneze (kjer startamo iz fosfoenolpiruvata) in kalvinovega cikla deluje fruktoza-bifosfat aldolaza v obratni smeri (pretvori gliceraldehid-3-fosfat in dihidroksiacetonfosfat v fruktozo-1,6-bifosfat). Poleg interakcije s triozafosfat izomerazo vstopa fruktoza-bifosfat aldolaza v interakcije z fosfoglicerat mutazo, fosfoglicerat kinazo, enolazo, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo, piruvat dekarboksilazo in alkohol dehidrogenazo (Punta in sod., 2007).

Rezultati nakazujejo na znižano raven encima pri obeh ekstraktih (Preglednica 8). Rezultat je posledica vsote interakcij elementov ekstrakta med seboj (glavni element pa so polifenoli). Vrednosti so smiselne saj lahko sklepamo na nižji pretok glikolize in s tem manjšo verjetnost za akumulacijo elektronov s strani  $NADH + H^+$  v elektronski transportni verigi. S tem se zmanjša verjetnost za nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti. Glede na to, da aktin stabilizira interakcije glikolitičnih encimov in tudi preko acetilacije nadzoruje njihovo transkripcijo, se pojavi vprašanje o soodvisnem izražanju aktina in glikolitičnih encimov (Olivera-Araiza in sod., 2012). Vprašanje bi lahko rešili z mutagenezo transkripcijskega faktorja specifičnega za aktin, ki bi ji sledila metoda kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR) za preverjanje izražanja aktina in glikolitičnih encimov. Tudi tukaj bi morali za celotno sliko ravni proteina

analizirati vsaj še citosolno frakcijo, saj gre za protein, ki je prisoten tako v mitohondriih kot v citosolu. Znižana raven encima pomeni nižjo reakcijsko hitrost nastajanja gliceraldehid-3-fosfata, s tem pa počasnejšo glikolizo. Oba ekstrakta ste torej upočasnila metabolizem celic. Vpliv modificiranega ekstrakta je bil večji od vpliva intaktnega ekstrakta.

Če povežemo še z rezultati znižane ravni ATP sintaze, vidimo, da ekstrakta prispevata k rahlo s pretokom omejenemu in enakomerному metabolizmu. Pojav bi lahko enačili z izrazom kalorična restrikcija (angl. *calorie restriction*), ki ga omenja Lamming in sod. (2004). Ekstrakta oponašata kalorično restrikcijo, ki aktivira Sir2, protein družine sirtuinov, odgovoren za podaljšanje življenskega cikla celice (Lamming in sod., 2004).

Ponovno lahko argumentiramo, da so polifenoli lahko na raven encima vplivali z vezavo na promotor, na mRNA, na specifični transkripcijski faktor, na lokalizacijo proteina pa so lahko vplivali z direktno vezavo na protein. Tudi v tem primeru bi za realno oceno ravni morali preveriti še stanje v citosolni in jedrni frakciji.

## 5.8 KOFILIN-1

Kofilin-1 (Cof1) je protein z molekulsko relativno maso 16 kDa, ki je široko razširjen tako pri vretenčarjih, kot pri nižjih evkariontih (Moon in sod., 1993) in sodi v družino aktin-depolimerizajočih faktorjev (Preglednica 9). Zaznamuje ga motiv 150 aminokislin, ki predstavlja ADF-H domeno, značilno za razred aktin vezavnih faktorjev, med katere sodijo kofilini (destrin, aktoferin, depaktin) in tvinfilini (Punta in sod., 2007). Lokaliziran je v citoplazmi, na citoskeletu in v jedru (Bairoch in sod., 2005). Njegova glavna vloga je sodelovanje pri depolimerizaciji aktina (pretvorbo aktina iz F-aktina v G-aktin). Pri depolimerizaciji interagira s faktorji Srv2/CAP, Aip1 in profilinom (Balcer in sod., 2003). Sodelovanje pri depolimerizaciji aktina poudari biološko vlogo kofilina pri reguliraju mejotske redukcijske delitve, oblikovanju mikrofilamentov in s tem celični rasti in razmnoževanju.

Nadzorovanje depolimerizacije in polimerizacije aktina poudari pomembno vlogo kofilina pri inhibiciji metastaze (Weng in sod., 2012). V metastazi mora rakava matična celica preiti tri ovire: pritrjevanje na ekstracelularni matriks, aktivacija proteaz, ki razgradijo ekstracelularni matriks in potovanje skozi ekstracelularni matriks. Ob potovanju skozi matriks se pojavijo celični izrastki. Celična membrana se mora razširiti. Zato mora priti do intenzivne polimerizacije aktina, ki kot element citoskeleta tvori ogrodje za širjenje membrane. Kofilin sodeluje pri polimerizaciji (Weng in sod., 2012). Sodeluje pa tudi pri depolimerizaciji, saj je sposoben vezati tako F-, kot G- aktin (Ojala in sod., 2001).

Rezultati 2-D analize so pokazali 1,5-kratno znižanje ravni proteina pri intaktnem ekstraktu in trikratno znižanje pri ekstraktu po prehodu skozi model prebavnega trakta. Znižanje ravni kofilina torej pomeni zmanjšano raven polimerizacije aktina, kar omogoči inhibicijo metastaze. Do nje je lahko prišlo na osnovi interakcije polifenolov z mRNA, promotorjem ali specifičnim transkripcijskim faktorjem. Lahko je prišlo tudi do spremembe v lokalizaciji Cof1 na osnovi direktne interakcije z ekstraktom.

Ekstrakta bi pri človeku teoretično imela antikancerogen učinek. Tudi v tem primeru se moramo zavedati da gre za vpliv ekstrakta, ki je posledica interakcije vseh biološko aktivnih elementov v njem (Preglednica 8). Ravnotako bi morali biti pozorni na vse frakcije, ne zgolj na mitohondrijsko za realno oceno ravni kofilina.

### 5.9 CELOKUPNI VPLIV EKSTRAKTA PRED IN PO PREHODU SKOZI MODEL PREBAVNEGA TRAKTA

Ekstrakta lahko glede na rezultate delujeta po večih ključnih bioloških mehanizmih v interakcijski mreži, ki predstavljajo njuno biološko funkcijo (Slika 8) (Preglednica 10). Delujejo lahko kot antioksidanti in prispevajo k direktnemu znižanju nivoja reaktivnih kisikovih zvrsti. V tem primeru imajo visok reduksijski potencial že same po sebi in direktno reducirajo (lovijo) proste radikale. Ker celici nudijo zaščito pred prostimi radikali že sami po sebi, ni več potrebe vlagati energijo v sintezo proteinov toplotnega šoka (šaperoni in košaperoni). Zato se raven šaperonov in košaperonov direktno zniža. Do znižane ravni šaperonov in košaperonov lahko pridemo tudi indirektno tako, da ekstrakta delujeta kot proantioksidanta (Vertuani in sod., 2004). To bi pomenilo, da je skupen reduksijski potencial ekstraktov nizek in oksidacijska sposobnost visoka. V tem primeru bi po specifičnem mehanizmu lahko inducirala nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti. Lahko preko kovinskih ionov s Haber-Weisovo in Fentonovo reakcijo, preko vpliva na metabolne encime ali preko direktne oksidacije molekul. Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti lahko sproži signalno transdukcijo, ki vodi v aktivacijo transkripcije proteinov, odgovornih za odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti (superoksid dismutaza, peroksidaza, katalaza), košaperonov in šaperonov. Ko so reaktivne kisikove zvrsti odstranjene, se raven obrambnih proteinov ponovno zniža, ker po njih ni več potrebe. V tem primeru bi torej pri opazovanju časovno odvisnega izražanja proteinov opazili koncentracijski vrh.

Lahko pa ekstrakti tudi direktno vplivajo na sintezo proteinov. Vežejo se lahko na promotorski sistem, na transkripcijski faktor specifičen za šaperon ali košaperon, na mRNA ali na protein. Vendar je ekstrakt zmes bioaktivnih komponent. Vsaka bioaktivna komponenta v ekstraktu lahko deluje po kateremkoli od omenjenih mehanizmov. Delovanje ekstrakta je odvisno od interakcijske mreže, v katero so vključene bioaktivne komponente. Celoten ekstrakt lahko zato deluje po večih ali vseh omenjenih mehanizmih.

Celica se odziva na ekstrakte tudi na nivoju metabolizma. Glavni metabolni poti, ki sta v fazi stresa na udaru in se remodelirata s pomočjo ekstraktov, sta glikoliza (fruktoza-bifosfat aldolaza) in elektronska transportna veriga ( $F_1$ -ATPaza). Hkrati preko proteinov toplotnega šoka vplivata na enakomerno izražanje metabolnih proteinov in s tem enakomerno in uravnano hitrost metabolnih poti. Z vplivom direktno na uravnavanje izražanja  $F_1$ -ATPaze in fruktoza-bifosfat aldolaze sta ekstrakta vplivala na bolj hitrostno nadzorovan (omejen) in enakomeren pretok elektronov skozi glikolitični cikel in elektronsko transportno verigo. Na ta način sta zmanjšala verjetnost tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti, kar se kaže kot antioksidativni učinek. Hkrati energijo preusmerjajo v uravnavanje metabolizma. S tem lahko oponašajo kalorično restrikcijo, ki aktivira sistem sirtuinov, odgovoren za podaljšanje življenjskega cikla celice.

Tretja tarča ekstraktov je sam celični cikel, ki je hkrati povezan z metabolizmom in popravljalnim aparatom. Ekstrakta vplivata na regulacijo izražanja genov odgovornih za proces mitoze (Wtm1) in hkrati preko Hsp70 družine inhibirata apoptozo. Glavni vpliv ekstrakta pa se nanaša na aktin. Aktin je kot element mikrofibrilov vključen v strukturo niti delitvenega vretena. S tem je vključen v uravnavanje transporta kromosomov pri mejotski in mitotski delitvi celic. Hkrati kot element citoskeleta skrbi za transport endocitotskih veziklov, eksocitotskih veziklov, mitohondrijev in vakuol. S tem uravnava potek mitoze in mejoze. Pri kvasovkah je aktin vključen še v krčenje aktomiozinskega obroča v fazi ločevanja brsta od materiske celice. Ekstrakta torej vplivata tudi na enakomeren in uravnani potek celičnega cikla. Za opravljanje lastne funkcije je glavna oblika polimerizirana oblika aktina (F-aktin). Za reverzibilno reakcijo polimerizacije (depolimerizacije) je odgovoren kofilin. Ker pri rakastih celicah poteka intenzivna polimerizacija aktina in sta ekstrakta vplivala na znižano raven kofilina, sta s tem izkazala antikancerogeni učinek.

Če primerjamo delovanje obeh ekstraktov v celici na ravni proteoma, je ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta po večini imel poudarjen vpliv. Med prehodom skozi prebavni trakt lahko pride do oksidacije fenolnih spojin do fenoksilnih radikalov, ki delujejo podobno kot reaktivne kisikove zvrsti. Hkrati naj bi se fenolne spojine konjugirale z glukoronidom, sulfatnimi in metilnimi skupinami, kar poveča njihovo biodostopnost (Han in sod., 2007). Če polifenoli delujejo kot proantioksidanti, bodo molekule v oksidirani obliki, kar bo induciralo akumulacijo reaktivnih kisikovih zvrsti in indukcijo celici lastnega obrambnega mehanizma. Oksidacija v fazi prehoda skozi prebavni trakt bi v tem primeru še izdatno povečala njihovo sposobnost oksidacije, tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti in indukcije lastnega obrambnega mehanizma.

## 5.10 MOŽNOSTI IN IDEJE ZA NADALJNJE RAZISKAVE

Magistrska naloga je podlaga za številne nadaljnje raziskave vpliva polifenolov. Prvo izhodišče nadaljnjih raziskav tiči v dejstvu, da smo raziskave izvajali na ekstraktu pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta. Ker sklepamo, da je ekstrakt bogat s polifenoli, smo privzeli, da je glavna komponenta odgovorna za vplive na celico kot celoto. Zavedati pa se moramo, da so v ekstraktu še številne druge bioaktivne učinkovine, ki remodelirajo celični cikel in metabolizem celice. Vpliv ekstrakta je torej rezultat vpliva vseh bioaktivnih učinkovin, prisotnih v ekstraktu. Hkrati so učinkovine med seboj vključene v specifične interakcije, interakcijsko mrežo, v kateri se med seboj kemijsko modificirajo. Zato je vpliv posamezne komponente ekstrakta težko predvideti. Prehod ekstrakta skozi model prebavnega trakta pa je spremenil celotno interakcijsko mrežo. V nadaljnjih raziskavah bi bil zato potrebno ločiti ekstrakt na posamezne komponente. To lahko storimo S HPLC kromatografijo ali 2-D tekočinsko kromatografijo. Celice bi lahko nato tretirali z vsako od omenjenih komponent. Lahko bi tudi razvili biosenzor. Po ločitvi ekstrakta na posamezne komponente bi lahko več komponent označili s fluorescentnim barvilom in jih spustili preko plasti z delom celice (mitohondrij, tonoplast, citoskelet, stroma) in proučevali interakcije komponente s celico. Problem bi lahko rešili tudi s celičnimi mikromrežami, skozi katere bi spustili vzorec fluorescentno označenih komponent ekstrakta. Naslednji način pa je z mikromrežami. Za vsak

tip lovke bi ustvarili bi dve ločeni mikromreži. Kot lovke bi lahko uporabili DNA, RNA ali proteine kvasovke. Eno mikromrežo bi izpostavili fluorescentno označenemu referenčnemu vzorcu (ozadje ekstrakta) in ekstraktu pred prehodom skozi model prebavnega trakta, drugo pa referenčnemu vzorcu in ekstraktu po prehodu skozi model prebavnega trakta. Interakcijo komponent s proteini, DNA in RNA bi lahko proučili tudi z izolacijo DNA, RNA in proteinov. Željeno DNA in RNA bi lahko pridobili z aptameri, protein pa s protitelesi. Sledila bi metanolna ekstrakcija metabolitov ekstrakta in identifikacija z masno spektrometrijo. S tem bi prihranili čas glede na alternativno treturanje celic in kasnejšo 2-D analizo. Vsekakor pa bi lahko razvoj šel v smeri optimizacije 2-D elektroforeze. V fazi priprave gela bi lahko v gel dodali molekulo, ki bi blokirala prosta vezavna mesta in bi s tem zmanjšali "zabrisanost" elektroforetskih lis. Medsebojne interakcije bioaktivnih učinkovin pa je nekoliko težje preučevati. Lahko bi razvili metabolno mikromrežo, v kateri bi bili znani metaboliti nanešeni kot lovke, vzorec pa bi bil posamezna komponenta ekstrakta (npr. polifenol).

Drugo izhodišče nadalnjih raziskav predstavlja raziskava zgolj na mitohondrijski frakciji celic. Za oba ekstrakta bi morali analizirati tudi citosolno in jedrno frakcijo. Tako bi dobili jasnejšo oceno o celokupni ravni proteina. Protein se namreč v določenem časovnem izseku lahko nahaja na večih lokacijah hkrati in v različni zastopanosti.

Naslednje vprašanje, ki ga magistrska naloga ni mogla rešiti je, ali bi lahko pričakovali enake interakcije in s tem vpliv ekstrakta tudi pri ljudeh. Kvasovka se sicer smatra kot dovolj reprezentativen, hkrati pa enostavnejši organizem za gojenje in manipulacijo, kot sesalska celična linija. Vseeno pa ima nekoliko drugačen profil post-translacijskih modifikacij. Zato bi nadaljnje raziskave lahko bila usmerjene v razvoj novih metodologij za raziskave postranslacijskih modifikacij. Ena izmed njih bi lahko temeljila na sistemu, ki uporabi integracijo "highthroughput" metode sekvenciranja (Illumina) in sistem ditektne sinteze lovki na mikromreži. Vsako od 20 aminokislin bi lahko blokirali karboksilno skupino in radikal z molekulo, ki se ob izpostavitvi svetlobi odcepi. Uporabili bi membrano, ki bi bila razdeljena na točke, ki bi jih obsevali s svetlobo. V vsakem ciklu bi ploščo izpostavili eni od 20 aminokislin, ploščo pa bi obsevali na različnih mestih. S tem bi lahko sitetizirali več polipeptidov hkrati. Istočasno bi v vsakem ciklu dodali fluorescentno označeno glukozo, metilno skupino, fosfatno skupino in ostale elemente postranslacijskih modifikacij in zajeli sliko. Z zaporedjem barv bi lahko ugotovili profil post-translacijskih modifikacij proteina. Ko bi profil poznali, bi lahko na ločenih mikromrežah primerjali interakcije dveh variacij homologov (npr. človeškega proteina in proteina kvasovke) (nanešenih kot lovke) s posamezno komponento ekstrakta (npr. polifenolom).

Vse raziskave pa bi morale biti usmerjene v odkritje polifenola z visoko farmacevtsko vrednostjo.

### 5.11 APLIKACIJE POLIFENOLOV

Ker rezultati magistrske naloge kažejo na ugoden vpliv polifenolov, se vidijo njihove aplikacije v farmacevtski industriji (npr. za zdravljenje raka). Ker so mezenhimske matične celice znane po njihovi sposobnosti migriranja na mesto tumorja, bi lahko na njih osnovali

biološko zdravilo. Izolirali bi jih lahko iz popkovnične krvi in v njih z MAC vektorjem vstavili gene, ki kodirajo zapis za encime, ki so vključeni v sintezo polifenolov (ali specifičnega polifenola z visoko farmacevtsko vrednostjo). Polifenoli bi bili preko skupine, ki je vključena v post-translacijsko modifikacijo (npr. glukoza ali metilna skupina) vezani na protein, ki se izraža na membrani. S tem bi s ciljanim mehanizmom dostavili do tumorja.

Drugo biološko zdravilo bi se nanašalo na bispecifično protitelo proti markerju na rakavi celici in proti encimu, ki bi imeli vezano neaktivno obliko polifenola. Ob dodatku ustreznega substrata v telo (aktivaciji encima), bi se polifenol pretvoril v aktivno obliko. S tem bi hkrati omogočili ciljano dostavo polifenola kot bioaktivne učinkovine in hkrati aktivacijo na mestu dostave.

## 6 SKLEPI

- Raziskave so potekale na ekstraktih, kjer so polifenoli vključeni v interakcijsko mrežo. Zato ne moremo vpliva ekstrakta enačiti z vplivom posameznih polifenolov na celico.
- Ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta je na proteomu pokazal večji vpliv kot intaktni ekstrakt.
- Raziskave mitohondrijske frakcije proteinov kvasovke, ki je bila izpostavljena ekstraktoma pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta so pokazale, da ekstrakta vplivata na proteinski aparat, ki je direktno vključen v odziv na stres (šaperoni Hsp70, košaperoni, aktin in transkripcijski modulator Wtm1), proteine, ki so vključeni v celični energijski metabolizem ( $F_1$  ATPaza in fruktoza bifosfat aldolaza) in proteine, vključene v celični cikel (aktin, kofilin)
- Rezultati delovanja ekstrakta morske alge v celici nakazujejo na antioksidativno oz. proantioksidativno aktivnost ter antikancerogeno delovanje.
- Ekstrakta z uravnavanjem metabolnega pretoka prispevata k usmerjenemu in omejenemu metabolizmu.
- Za realnejšo sliko ravni proteinov bi morali v raziskave vključiti tudi citosolno in jadrno frakcijo celičnega ekstrakta.
- Polifenoli so naravne bioaktivne učinkovine z velikim potencialom v farmacevtski in živilski industriji.
- Kvasovka je primeren organizem za raziskavo polifenolov, saj ima poleg visokega deleža homolognih proteinov in s tem podobne osnovne metabolne poti in obrambni mehanizem pred sesalskimi celicami še številne tehnične prednosti, vendar je vpliv ekstrakta še vedno težko prenesti oz. ekstrapolirati na človeka, saj imata kvasovka *S. cerevisiae* in človek drugačen profil glikozilacije proteinov.

## 7 POVZETEK

Polifenoli so bioaktivne učinkovine z najširšim spektrom pozitivnih učinkov tako na produkcijski organizem (zaščita pred UV in škodljivci) kot na druge organizme (antioksidativni, antikancerogen, hepatoprotektiven, antidiabetični in imunomodulatoren učinek). Do sedaj še ni bilo zaslediti raziskave, ki bi uporabila sistemski pristop pri raziskavi vpliva polifenolov na enostavnem *in vivo* modelu, niti raziskave, ki bi upoštevale modifikacijo polifenolov v raziskavah njihovih vplivov. Zato je bil naš cilj s sistemskim pristopom 2-D elektroforeze primerjati vpliv s polifenoli bogatega ekstrakta morske alge *Fucus vesiculosus* pred in po prehodu skozi model prebavnega trakta na diferencialno izražanje proteinov kvasovke *S. cerevisiae*. Namen je bil tudi dobiti vpogled v mehanizem delovanja ekstrakta, bogatega s polifenoli. Rezultati so pokazali, da oba ekstrakta (ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta nekoliko bolj) delujeta na nivoju proteinskega aparata, odgovornega za odziv na stres (šaperoni, košaperoni in transkripcijski modulator Wtm1), na nivoju celičnega metabolizma ( $F_1$ -ATPaza in fruktoza-bifosfat aldolaza) in na nivoju celičnega cikla (aktin, kofilin). Z biološkega stališča lahko polifenoli delujejo kot antioksidanti, ki direktno reducirajo reaktivne kisikove zvrsti. Lahko pa delujejo kot proantioksidanti, ki reaktivne kisikove zvrsti odstranijo z indukcijo lastnega obrambnega sistema. Obrambni sistem lahko inducira z oksidacijo molekul, pri čemer nastanejo reaktivne kisikove zvrsti. Lahko tudi sprožijo akumulacijo reaktivnih kisikovih zvrsti preko oksidacije železovih ionov (Haber-Weisova in Fentonova reakcija). Lasten obrambni sistem lahko aktivirajo tudi direktno z vezavo na promotorje, mRNA ali na transkripcijske faktorje. Rezultati nakazujejo tudi na njihov antikancerogen učinek preko inhibicije izražanja ciklofilinov (kofilina in peptidil-prolin cis/trans izomeraze) in preko vpliva na popravljalne mehanizme DNA. Poleg tega lahko z enakomernim metabolizmom vplivajo na indukcijo sirtuinov, ki podaljšajo življenjsko dobo celice. S tem je poudarjen potencial polifenolov v medicinski stroki bodisi kot proantioksidanti, kot antioksidanti, ali kot antikancerogeni in usmerja v nadaljnja odprta vprašanja. Ekstrakt po prehodu skozi model prebavnega trakta je imel večji vpliv kot ekstrakt pred prehodom (intakten ekstrakt).

## 8 VIRI

- Albert S., Horbach R., Deising H.B., Siewert B., Csuk R. 2011. Synthesis and antimicrobial activity of (E) Stilbene derivatives. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 19: 5155-5166
- Amsler C.D., Iken K., McClintock J.B., Baker B. 2010. Defenses of Polar macroalgae against herbivores and biofoulers. V: *Marine and freshwater botany: biology of polar benthic algae*. Wiencke C. (ed.). New York, Walter de Gruyter: 101-120
- Andrade P.B., Barbosa M., Matos R.P., Lopes G., Vinholes J., Mouga T., Valentão P. 2013. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry*, 138: 1819-1828
- Ayaz F.A., Hayirhoglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Grúz J., Valentová K., Ulrichová J., Strnad M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC). *Food Chemistry*, 107: 19-25
- Bairoch A., Apweiler R., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M., Natale D.A., O' Donoran C., Redaschi N., Yeh L.S.L. 2005. The Universal Protein Resourse (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 33: D154-D159, doi: 10.1093/nar/gki070
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203
- Balcer C.I., Goodman A.L., Rodal A.A., Smith E.E., Kegler J., Hensen J.E., Goode B.L. 2003. Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv/CAP complex cofillin, profiling an Aip. *Current Biology*, 13: 2159-2169
- Barsanti L., Gualtieri P. 2006. *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*. 1<sup>st</sup> ed. New York, Taylor and Francis Group: 320 str.
- Becker J., Walter W., Yan W., Craig E.A. 1996. Functional interaction of cytosolic Hsp 70 and a Dna J-related protein Ydj1 in protein translation *in vivo*. *Molecular and Cell Biology*, 16: 4378-4386
- Bell D., Ferrari P. 2009. A new use of conjugated linoleic acid. European Patent Application EP 2 014 179 A1: 18 str.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76
- Bi E., Maddox P., Lew D.J., Samon E.D., McMillan J.N., Yen E., Pringle J.R. 1998. Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 142: 1301-1312
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Challinor V.L., Stuthe J.M., Parsons P.G., Lambert L.K., Lehmann R.P., Kitching W., De Voss J.J. 2012. Structure and bioactivity of steroid saponins isolated from the roots of *Chamaelirium luteum* (False Unicorn). *Journal of Natural Products*, 75: 1469-1479
- Chang A., Sheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D. 2009. BRENDa, AMENDA and FRENDa the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research*, 37: D588-D592

- Cigut T., Polak T., Gašperlin L., Raspor P., Jamnik P. 2011. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 11449-11455
- Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinati N., Morozovich E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A., Iacobelli S., Nifantiev N.E. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17: 541-552
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovaninni C., Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanitá*, 43: 348-361
- Delgado-Adámez J., Fernández-León M.F., Velardo-Micharet B., González-Gómez D. 2012. *In vitro* assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 2481-2486
- Demain A.L., Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27: 297-306
- Delgado N.S. 2012. A novel mechanism regulates ribonucleotide reductase function in response to iron deficiency. *FEBS Journal*, 279: 271-271
- Dewick P.M. 2002. Medicinal natural products; a biosynthetic approach. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester, John Wiley and sons, LTD: 507 str.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660
- Dey P.M., Harborne J.M. 1997. Plant biochemistry. 1<sup>ed</sup>. London, Academic Press: 554 str
- Dziri S., Hassen I., Fatnassi S., Mrabet Y., Casabianca H., Hanchi B., Hosni K. 2012. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of Functional Foods*, 4: 423-432
- Edziri H., Ammar S., Souad L., Mahjoub M.A., Mastouri M., Aouni M., Mighri Z., Verschaeve L. 2012. *In vitro* evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of some Tunisian vegetables. *South African Journal of Botany*, 78: 252-256
- El Gamal A.A. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 1-25
- Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G., Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3774-3779
- Fazio A., Plastina P., Meijerink J., Witkamp R.F., Gabriele B. 2013. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. 2013. *Food Chemistry*, 140: 817-824
- Fracasseti D., Costa C., Moulay L., Tomás-Barberán F.A. 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two power products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139: 578-588
- FSC. 2008. Bladderwrack (*Fucus vesiculosus*). Amersham, FSC-Field Studies Council: 1 str.

- [\(7.7.2013\)](http://www.theseashore.org.uk/theseashore/SpeciesPages/Bladderwrack%20French.jpg.html)
- Gao Z.P., Yu Z.F., Yue T.L., Queck S.Y. 2013. Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols separation from kiwifruit juice using adsorbent resin. *Journal of Food Engineering*, 46: 195-201
- Görg A., Obermeier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21: 1037-1053
- Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M. 2004. "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 187-206
- Guthrie C., Fink G.R. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*, 194: 1-863
- Halliwell B. 2008. Are polyphenols antioxidants or prooxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 107-112
- Han X., Shen T., Lou H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 950-988
- Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O'Grady M.N., Kerry J.P. 2011. Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126: 948-955
- Hossain M.A., Rahman S.M.M. 2011. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44: 672-676
- Jananthi P., Lalitha P. 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3: 1-3
- Kaisoon O., Siriamornpun S., Weerapreeyakul N., Meeso N. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods*, 3: 88-99
- Kanehisa M., Goto S. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28: 27-30
- Karsten V., Wulff A., Michael Y., Müller R., Steinhoff F.S., Federsdorf J., Wiencke C., 2010. Physiological responses of polar benthic algae to ultraviolet radiation. V: Marine and freshwater botany: biology of polar benthic algae. Wiencke C. (ed.). New York, Walter de Gruyter: 271-298
- Katalinic V., Milos M., Kulusic T., Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94: 550-557
- Kim S.J., Cho A.R., Han J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29: 112-120
- Kilani-Jaziri S., Bhouri W., Skandrani I., Limem I., Chekir-Ghedira L., Ghedira K. 2011. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. *South African Journal of Botany*, 77: 767-776
- Kitzberger C.S.G., Smânia A., Pedrosa R.C., Ferreira S.R.S. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 80: 631-638

- Koolen H.H.F., da Silva F.M.A., Gozzo F.C., de Souza A.Q.L., de Souza A.D.L. 2013. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51: 467-473
- Korpinen S., Jormalainen V. 2008. Grazing and nutrients reduce recruitment success of *Fucus vesiculosus* L. (*Fucales: Phaeophyceae*). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78: 437-444
- Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C., Abdelly C. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2083-2091
- Kubola J., Siriamornpun S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry*, 110: 881-890
- Kukić J., Popović V., Petrović S., Mucaji P., Ćirić A., Stojković D., Soković M. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107: 861-868
- Kunyanga C.N., Imungi J.K., Okoth M.W., Biesalski H.K., Vadivel V. 2012. Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *Food Science and Technology*, 45: 269-276
- Lamming D., Wood S., Sinclair D.A. 2004. Small molecules that regulate lifespans: evidence for xenohormesis. *Molecular Microbiology*, 53: 1003-1009
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. ClustalW and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948
- Lee H.S., Jeon Y.J. 2013. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia*, 86, 129-136
- Lee J., Kim S.S. 2010. Current implications od cyclophylins in human cancers. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29:97-103
- Lee Y.D., Elledge S.J. 2006. Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes and Development*, 20: 334-344
- Lee S.-M., Lee S.-B., Park C.-H., Choi J. 2006. Expression of heat shock proteins and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chiromidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*, 65: 1074-1081
- Li J., Richter K., Buchner J. 2011. Mixed Hsp90 cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18: 61-66
- Lopez-Bueza P., Pfund C., Craig E.A. 1998. The biochemical properties of the ATPase activity of a 70 kDa heat shock protein (Hsp70) are governed by the C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 15253-15258
- Lowry O.H., Rosenbrough A. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275

- Luther M., Parry J., Moore J., Meng J., Zhang Y., Cheng Z., Yu L. 2007. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 104: 1065-1073
- Ma D. 2001. Applications of yeast in drug discovery. *Progress in Drug Research*, 57:117-162.
- Maglott D., Ostell J., Pruitt K.D., Tatusova T. 2007. Entrez gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Research*, 35: D26-D31, doi: 10.1093/nar/gkl993
- Marsal A., Maldonado F., Cuadros S., Bautista M.E., Mauich A.M. 2012. Adsorption isotherm, thermodynamic and kinetic studies of polyphenols onto tannery shavings. *Chemical Engineering Journal*, 183: 21-29
- Mayr C., Richter K., Lilie H., Buchner J. 2000. Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90 associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae* differ in their functional properties. *Journal of Biology and Chemistry*, 275: 34140-34146
- Mayer M.P., Bukan B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell and Molecular Life Sciences*, 62: 670-684
- Medina A.L., Haas L.I.R., Chaves F.C., Salvador M., Zambiasi R.C., da Silva W.P., Nora L., Rombaldi C.V. 2011. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128: 916-922
- Mhadhebi L., Laroche- Clary A., Robert J., Bouraoui A. 2011. Anti-inflammatory, anti-proliferative, anti-oxidant activities of organic extract from the Mediterranean seaweed, *Cystoseira crinita*. *African Journal of Biotechnology*, 10: 16682-16690
- Moon A., Janmey P., Louie A., Drubin D. 1993. Cofilin is an essential component pf the yeast cortical cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 120: 421-435
- Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO. 2013. Gastrointestinal models (TIM) with high predictive power. Delft, Netherlands Organization for Applied Scientific Research TNO: 2 str.  
[http://www.tno.nl/content.cfm?context=thema&content=markt\\_product&laag1=891&laag2=195&laag3=320&item\\_id=1100&Taal=2](http://www.tno.nl/content.cfm?context=thema&content=markt_product&laag1=891&laag2=195&laag3=320&item_id=1100&Taal=2) (28.6.2013)
- Nithiyanantham S., Selvakumar S., Siddhuraju P. 2012. Total phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27: 52-60
- Oh J., Jo H., Cho A.R., Kim S. -J., Han J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31: 403-409
- Ohala P.J., Paarilainen V., Lappalainen P. 2001. Identification of yeast cofilin residues specific for actin monomer and PIP2 binding. *Biochemistry*, 40: 15562-15569
- Olivera-Araiza D., Felix-Chiquete N., Mújica A., Uribe- Carapo S., Peña A. 2012. The association of glycolytic enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* is stabilized by actin. *FEBS Journal*, 279: 273-273
- Othman A., Ismail A., Ghani N.A., Adenan I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100: 1523-1530
- Park E.-J., Jhon D.-Y. 2010. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. *Food Science and Technology*, 43: 655-659

- Park E.Y., Kim E.H., Kim M.H., Seo Y.W., Lee J.I., Jun H.S. 2012. Polyphenol-rich fraction of brown alga *Ecklonia cava* collected from Gijany, Korea, reduces obesity and glucose levels in high-fat diet-induced obese mice. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2012: 1-11
- Parys S., Kehraus S., Krick A., Glombitza K.W., Carmeli S., Klime K., Gerhäuser C., König G.M. 2010. *In vitro* chemopreventive potential of fucophloethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. Phytochemistry, 71: 221-229
- Pearl L.H., Prodromou C. 2000. Structure and *in vivo* function of Hsp90. Current Opinion in Structural Biology, 10: 46-51
- Pearl L.H., Prodromou C. 2001. Structure, function and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. Advances in Protein Chemistry, 59: 157-186
- Plaza M., Santoyo S., Jaime L., Reina G.G.B., Herrero M., Señoráns F.J., Ibáñez E. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51: 450-455
- Plemberton L.F., Blobel G. 1997. Characterization of the Wtm proteins, a novel family of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional modulators with roles in meiotic regulation and silencing. Molecular and Cell Biology, 17: 4830-4841
- Porschewski P., Specht V., Stubuer S., Kindl H. 2001. A novel tetratricopeptide repeat containing J-protein localized in a plasma membrane-bound protein complex of the phytopathogenic oomycete *Phytophthora megasperma*. European Journal of Cell Biology, 8: 527-538
- Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.-J.E., Komaitis M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry, 95: 664-671
- Pruyne D., Bretscher A. 2000. Polarization of cell growth in yeast. Journal of Cell Science, 43: 571-585
- Punta M., Coggill P.C., Eberhardt R.Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Cerqueira G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E.L.L., Eddy S.R., Bateman A., Finn R.D. 2007. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Research, 40: D290-D301, doi: 10.1093/nar/gtr/1065
- Quideau S. 2009. Chemistry and biology of Ellagitannins: An underestimated class of bioactive plant polyphenols. 1<sup>st</sup> ed. Singapore, World Scientific. 374 str.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. Angewandte Chemie International Edition, 50: 586-621
- Rahman A. 2008. Studies in natural products chemistry- Vol. 34: Bioactive natural products. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier: 1007 str.
- Rindi F., Guiry M.D. 2004. Composition and spatio temporal variability of the epiphytic macroalgal assemblage of *Fucus vesiculosus* Linnaeus at Clare Island, Mayo, Western Ireland. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 311: 233-252
- Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A.-H., Khalel K.I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Industrial Crops and Products, 44: 437-445

- Rodriguez M., Alves G., Abranten J., Flacão A. 2013. Herb-dry interaction of *Fucus vesiculosus* extract and amiodaron in rats: A potential risk for reduced bioavailability of amiodaron in clinical practice. *Food and Chemical Toxicology* 52, 121-128
- Saarinen N.M., Penttinen P.E., Smets A.I., Hurmerinta T.T., Mäkelä S.I. 2005. Structural determinants of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses *in vivo*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 93: 209-219
- Salgado P.R., López-Caballero M.E., Gómez-Gullén M.C., Mauri A.N., Montero M.P. 2012. Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 29: 374-381
- Santos-Buelga C., Escribano-Bailón M., Attazio V. 2010. Recent advances in polyphenol research. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, John Wiley and Sons: 2070 str.
- Seznam rastlin. 2013. Ljubljana, Botanični vrt Univerze v Ljubljani, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta: 94 str.  
<http://www.botanicni-vrt.si/seznam-rastlin> (7.7.2013)
- Shen X., Mizuguchi G., Hamiche A., Wu C. 2000. A chromatin remodeling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, 406: 541-544
- Sivam A.S., Sun-Waterhouse D., Perera C.O., Waterhouse G.I.N. Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131: 802-810
- Soares A.A., de Souza C.G.M., Daniel F.M., Ferrari G.P., da Costa S.M.G., Peralta R.M. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, 112: 775-781
- Song Y., Masisan D.C. 2005. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1p (Hop1). *Journal of Biology and Chemistry*, 280: 34178-34185
- Stagos D., Amoutzias G.D., Matakos A., Spyrou A., Tsatsakis A.M., Kouretas D. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 2155-2170
- Stebbins C.E. Russo A.A. Schneider C.C. Rosen N., Horste F.U., Pavletich N.P. 1997. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 89: 239-250
- Taviano M.F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Güvenç, Pasquale R.D., Miceli N. 2013. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth.&Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29
- Taylor W.R., 1957. Marine algae of the northeastern coast of North America. 2<sup>nd</sup> ed. Ann Arbor, The University of Michigan Press: 508 str.
- Tran P.L., Kim S.-A., Choi H.S., Yoon J.-H., Ahn S.-G. 2010. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of Hsp70 and Hsp90 and exhibits anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*, 10: 276, doi: 10.1186/1471-2407-10-276: 9 str.
- Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101: 267-273

- Utley R.T., Lacoste N., Jobin-Robitaille O., Allard C., Cote J. 2005. Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Molecular and Cell Biology*, 25:8190-8179
- Vadivel V., Biesalski H.K. Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. Pierre seeds. *Process Biochemistry*, 46: 1973-1980
- Veena C.K., Josephine A., Preetha S.P., Varalakshmi P. 2007. Beneficial role of sulfated polysaccharides from edible seaweed *Fucus vesiculosus* in experimental hyperxaluria. *Food Chemistry*, 100: 1552-1559
- Vertuani S., Angusti A., Manfradini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 1677-1694
- Von Mering C., Huynen M., Jaeggi D., Schmidt S., Bork P., Snel B. 2003. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research*, 31: 258-261
- Vreeland V., Waite J.H., Epstein L. 1998. Phenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *Journal of Physiology*, 34: 1-8
- Wegele H., Halsbeck M., Reinstein J., Buchner J. 2003. Sti1 is a novel activator of the SSA proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 25970-25976
- Werner-Washburne M., Stone P.E., Craig E.A. 1987. Complex interactions among members of an essential subfamily of Hsp70 genes in *S. cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*, 71: 2568-2577
- Weng C.-J., Yen G.-C. 2012. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38: 76-87
- Wulff A., Iken K., Quartino M.L., Hamdal A.A., Wiencke C., Clayton M.N. 2010. Biodiversity, biogeography and zonation of marine benthic micro- and macroalgae in the Arctic and Antarctic. V: Marine and freshwater botany: Biology of polar benthic algae. Wiencke C. (ed.). New York, Walter de Gruyter: 23-53
- Zakrajšek T., Raspor P., Jamnik P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism- characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, 74: 2837-2845
- Zheng J., Ramirez V.P. 2009. Inhibition of mitochondrial protein F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *British Journal of Pharmacology*, 130: 1115-1123
- Zhang Z., An X., Yang K., Perlstein D.L., Hicks L., Kelleher N., Stubbe J., Huang M. 2006. Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 1422-1427

## ZAHVALA

Prva in iskrena zahvala je namenjena mentorici, prof. dr. Poloni Jamnik za vrhunsko vodenje, čas in trud pri nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki, prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za strokoven pregled magistrskega dela in vse nasvete, ki so pripomogli k njegovemu izboljšanju.

Hvala Katedri za mikrobiologijo, biotehnologijo in varnost živil, ker mi je omogočila praktično izvedbo magisterija.

Posebna zahvala pa gre mojim najbližnjim za vse vzpodbudne besede, ki so mi jih namenili tokom študija in ob zagovoru.

## PRILOGE

### Priloga A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Seznam rastlin, 2013)

POLIFENOL	PODTIP POLIFENOLA	VIR	LATINSKO IME	DRUŽINA	SLOVENSKO IME DRUŽINE
ANTOCIANINI	pomaranča	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	rutičevke	
	vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	vinikovke	
	zelje	<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	križnice	
	fižol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	metuljnice	
	čebula	<i>Allium cepa</i>	Alliaceae	lukovke	
	redkev	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	križnice	
	robida	<i>Rubus fruticosus</i>	Rosaceae	rožnice	
	črni ribez	<i>Ribes nigrum</i>	Grossulariaceae	kosmuljevke	
	akacija	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosaceae	mimozovke	
	nagoj	<i>Cassia siamea</i>	Caesalpiniaceae	rožičevke	
	rumena žametnica	<i>Tagetes erecta</i>	Asteraceae	nebinovke	
	ostrica	<i>Cyperus rotundus</i>	Cyperaceae	ostričevke	
	šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	Marasmiaceae	sehličarke	
	mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	octovke	
	banana	<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	banaanovke	
	borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	vresovke	
	sliva	<i>Prunus virginiana</i>	Rosaceae	rožnice	
	grah	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	metuljnice	
	sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	nebinovke	
FLAVONOIDI	Flavanoli	marelica	<i>Prunus armeniaca</i>	Rosaceae	rožnice
	češnja	<i>Rhamnus pumilus</i>	Rhamnaceae	krhlikovke	
	jabolko	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	rožnice	
	vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	vinikovke	
	akacija	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosaceae	mimozovke	
	ananas	<i>Ananas sativus</i>	Bromeliaceae	ananasovke	
	japonska sliva	<i>Prunus salicina</i>	Rosaceae	rožnice	
	luk	<i>Allium roseum</i>	Alliaceae	lukovke	
	navadna tamariša	<i>Tamarix gallica</i>	Tamariaceae	tamariševke	
	šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	Marasmiaceae	sehličarke	
	mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	octovke	
				se nadaljuje	

nadaljevanje priloge A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Seznam rastlin, 2013)

POLIFENOL	PODTIP POLIFENOLA	VIR	LATINSKO IME	DRUŽINA	SLOVENSKO IME DRUŽINE
<b>Flavanoni</b>		banana	<i>Musa sapientum</i>	<i>Musaceae</i>	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		kokos	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	palmovke
		grah	<i>Pisum sativum</i>	<i>Fabaceae</i>	metuljnice
		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	nebinovke
		pomaranča	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Rutaceae</i>	rutičevke
		grenivka	<i>Citrus paradisi</i>	<i>Rutaceae</i>	rutičevke
		paradižnik	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Solanaceae</i>	razhudnikovke
		meta	<i>Mentha piperita</i>	<i>Lamiaceae</i>	ustnatice
		limona	<i>Citrus limon</i>	<i>Rutaceae</i>	rutičevke
		akacija	<i>Acacia decurrens</i>	<i>Mimosaceae</i>	mimozovke
		ananas	<i>Ananas sativus</i>	<i>Bromeliaceae</i>	ananasovke
		luk	<i>Allium roseum</i>	<i>Alliaceae</i>	lukovke
<b>Flavonoli</b>		navadna tamarisa	<i>Tamarix gallica</i>	<i>Tamariaceae</i>	tamariševke
		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Marasmiaceae</i>	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	<i>Musaceae</i>	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		kokos	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	palmovke
		grah	<i>Pisum sativum</i>	<i>Fabaceae</i>	metuljnice
		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	nebinovke
		jabolko	<i>Malus domestica</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		čebula	<i>Allium cepa</i>	<i>Alliaceae</i>	lukovke
		ohrov	<i>Brassica olearcea</i> var. <i>sabauda</i>	<i>Brassicaceae</i>	križnice
		por	<i>Allium porrum</i>	<i>Alliaceae</i>	lukovke
		brokoli	<i>Brassica olearcea</i> var. <i>Italica</i>	<i>Brassicaceae</i>	križnice
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	vinikovke
		akacija	<i>Acacia decurrens</i>	<i>Mimosaceae</i>	mimozovke
		ananas	<i>Ananas sativus</i>	<i>Bromeliaceae</i>	ananasovke
					se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Seznam rastlin, 2013)

POLIFENOL	PODTIP POLIFENOLA	VIR	LATINSKO IME	DRUŽINA	SLOVENSKO IME DRUŽINE
Izoflavoni	japonska sliva	<i>Prunus salicina</i>	Rosaceae	rožnice	
	luk	<i>Allium roseum</i>	Alliaceae	lukovke	
	navadna tamariša	<i>Tamarix gallica</i>	Tamariaceae	tamariševke	
	šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	Marasmiaceae	sehličarke	
	mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	octovke	
	banana	<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	banaanovke	
	borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	vresovke	
	sliva	<i>Prunus virginiana</i>	Rosaceae	rožnice	
	kokos	<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	palmovke	
	grah	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	metuljnice	
	sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	nebinovke	
	soja	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	metuljnice	
	alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	metuljnice	
	zemeljski orešček	<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae	metuljnice	
	grah	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	metuljnice	
	fižol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	metuljnice	
Flavoni	akacija	<i>Acacia decurrens</i>	Mimosaceae	mimožovke	
	ananas	<i>Ananas sativus</i>	Bromeliaceae	ananasovke	
	luk	<i>Allium roseum</i>	Alliaceae	lukovke	
	navadna tamariša	<i>Tamarix gallica</i>	Tamariaceae	tamariševke	
	šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	Marasmiaceae	sehličarke	
	mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	octovke	
	banana	<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	banaanovke	
	borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	vresovke	
	sliva	<i>Prunus virginiana</i>	Rosaceae	rožnice	
	kokos	<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	palmovke	
	grah	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	metuljnice	
	sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	nebinovke	
	mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	rutičevke	
	peteršilj	<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	kobulnice	
	zelena	<i>Apium graveolens</i>	Apiaceae	kobulnice	
					se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Seznam rastlin, 2013)

POLIFENOL	PODTIP POLIFENOLA	VIR	LATINSKO IME	DRUŽINA	SLOVENSKO IME DRUŽINE
FENOLNE KISLINE	<b>Hidroksibenzojske kisline</b>	akacija	<i>Acacia decurrens</i>	<i>Mimosaceae</i>	mimozovke
		ananas	<i>Ananas sativus</i>	<i>Bromeliaceae</i>	ananasovke
		luk	<i>Allium roseum</i>	<i>Alliaceae</i>	lukovke
		navadna tamariška	<i>Tamarix gallica</i>	<i>Tamaricaceae</i>	tamariševke
		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Marasmiaceae</i>	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	<i>Musaceae</i>	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		kokos	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Arecaceae</i>	palmovke
		grah	<i>Pisum sativum</i>	<i>Fabaceae</i>	metuljnice
		brin	<i>Juniperus oxycedrus</i>	<i>Cupressaceae</i>	cipresovke
		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	nebinovke
		vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	vinikovke
		črni ribez	<i>Ribes nigrum</i>	<i>Grossulariaceae</i>	kosmuljevke
		kazuarina	<i>Casuarina equisetifolia</i>	<i>Casuarinaceae</i>	kazuarinovke
		črni poper	<i>Piper nigrum</i>	<i>Piperaceae</i>	poprovke
		navadni repik	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		šmarna hrušica	<i>Amelanchier ovalis</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		lepa plahtica	<i>Alchemilla speciosa</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		kodrolistni ohrov	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	<i>Brassicaceae</i>	križnice
		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Marasmiaceae</i>	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	<i>Musaceae</i>	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		guava	<i>Psidium cattleianum</i>	<i>Myrtaceae</i>	mirtovke
		bambus	<i>Bambuseae</i>	<i>Poaceae</i>	trave
		grah	<i>Pisum sativum</i>	<i>Fabaceae</i>	metuljnice
		kamilica	<i>Matricaria chamomila</i>	<i>Asteraceae</i>	nebinovke
					se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Seznam rastlin, 2013)

POLIFENOL	PODTIP POLIFENOLA	VIR	LATINSKO IME	DRUŽINA	SLOVENSKO IME DRUŽINE
Hidroksicimetne kisline		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	nebinovke
		vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	vinikovke
		sliva	<i>Coffea arabica</i>	Rubiaceae	broščevke
		jaboko	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	rožnice
		kivi	<i>Actinidia chinensis</i>	Actinidiaceae	aktinidihevke
		pšenica	<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	trave
		kodrolistni ohrov	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Brassicaceae	križnice
		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	Marasmiaceae	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	Rosaceae	rožnice
		guava	<i>Psidium cattleianum</i>	Myrtaceae	mirtovke
		bambus	<i>Bambuseae</i>	Poaceae	trave
		grah	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	metuljnice
		kamilica	<i>Matricaria chamomilla</i>	Asteraceae	nebinovke
		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	nebinovke
FENOLNI ALKOHOLI		oljka	<i>Olea europea</i>	Oleaceae	oljkovke
		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	Marasmiaceae	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	Rosaceae	rožnice
		grah	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	metuljnice
STILBENI		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	nebinovke
		vinska trta	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	vinikovke
		zemeljski orešek	<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae	metuljnice
		jagoda	<i>Fragaria vesca</i>	Rosaceae	rožnice
		dresen	<i>Polygonum caspidatum</i>	Polygonaceae	dresnovke
		bela čmerika	<i>Veratrum album</i>	Liliaceae	lilijevke
					se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Viri polifenolov s pripadajočo uvrsttvijo v družino (Seznam rastlin, 2013)

POLIFENOL	PODTIP POLIFENOLA	VIR	LATINSKO IME	DRUŽINA	SLOVENSKO IME DRUŽINE
LIGNANI		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Marasmiaceae</i>	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	<i>Musaceae</i>	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		grah	<i>Pisum sativum</i>	<i>Fabaceae</i>	metuljnice
		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	nebinovke
		lan	<i>Linum campanulatum</i>	<i>Linaceae</i>	lanovke
		riž	<i>Oryza sativa</i>	<i>Poaceae</i>	trave
		pšenica	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Poaceae</i>	trave
		ječmen	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Poaceae</i>	trave
		šiitake	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Marasmiaceae</i>	sehličarke
		mango	<i>Mangifera indica</i>	<i>Anacardiaceae</i>	octovke
		banana	<i>Musa sapientum</i>	<i>Musaceae</i>	banaanovke
		borovnica	<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	vresovke
		sliva	<i>Prunus virginiana</i>	<i>Rosaceae</i>	rožnice
		grah	<i>Pisum sativum</i>	<i>Fabaceae</i>	metuljnice
		sončnica	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	nebinovke