

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina JURICH

**KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI
ORGANIZEM ZA PROUČEVANJE VPLIVA
RASTLINSKIH EKSTRAKTOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina JURIČ

**KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI
ORGANIZEM ZA PROUČEVANJE VPLIVA
RASTLINSKIH EKSTRAKTOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AS A MODEL
ORGANISM FOR
EVALUATING INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra RASPORJA, za somentorico doc. dr. Polono JAMNIK in za recenzentko Majo RAVNIKAR.

Mentor: prof. dr. Peter RASPOR

Somentorica: doc. dr. Polona JAMNIK

Recenzentka: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Nacionalni inštitut za biologijo,
Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina JURIC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22 + 579.26: 582.282.23: 615.322: 582.926.2(043)=163.6
KG	kvasovke/ fiziologija kvasovk/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / proteinski profil kvasovk/ zdravilne učinkovine/ <i>Mandragora officinarum</i> / nadlišček/ proteomika/ 2D-elektroforeza
AV	JURIČ, Tina
SA	RASPOR, Peter (mentor)/JAMNIK, Polona (somentorica)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA PROUČEVANJE VPLIVA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 60 str., 16 sl., 5 pril., 70 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za organizem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> je značilna visoka stopnja ohranjenosti celičnih procesov med kvasovkami ter višje razvitimi organizmi, zaradi česar smo kvasovko uporabili kot orodje pri študiju vpliva zdravilnih učinkovin; ekstrakta nadliščka (<i>Mandragora officinarum</i>). Analizo proteinov celičnega ekstrakta kvasovke, tretirane z različnimi vzorci (vino/ekstrakt nadliščka v vinu/voda/kontrolna raztopina s standardoma skopolamina in atropina), smo izvedli z uporabo 2-D elektroforeze, pridobljene proteinske profile pa primerjali med seboj z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Dodatek 0,5 mL vzorca na 50 ml suspenzije kvasovk v fosfatnem pufru (koncetracija $1 \cdot 10^8$ celic/ml) oz. dodatek 5 mL vzorca na 45 mL suspenzije kvasovk v fosfatnem pufru je pokazal značilne spremembe v izražanju proteinov, kot odraz delovanja ekstrakta nadliščka. Ekstrakt nadliščka v vinu je glede na kontrolo (voda) pokazal ravno nasproten učinek na zvečanje/zmanjšanje intenzitete 2-D proteinskih lis kot samo vino. S primerjavo proteinskih profilov celic kvasovke tretirane z ekstraktom nadliščka in standardnima raztopinama skopolamina in atropina smo potrdili, da je za izražene spremembe proteinskega profila kvasovke <i>S. cerevisiae</i> odgovoren sinergističen vpliv substanc ekstrahiranih iz korena nadliščka. Rezultati so pokazali primernost <i>S. cerevisiae</i> kot uporabnega modela za študij vpliva ekstraktov nadliščka na ravni proteoma.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.22 + 579.26: 582.282.23: 615.322: 582.926.2(043)=163.6

CX yeasts/ fiziology of yeasts/ *Saccharomyces cerevisiae*/ protein profiles/medical substances/ *Mandragora officinarum*/ mandrake/ proteomics/ 2D-electrophoresis

AU JURIC, Tina

AA RASPOR, Peter (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/RAVNIKAR, Maja (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2009

TI YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AS A MODEL ORGANISM FOR EVALUATING INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XIII, 60 p., 16 fig., 5 ann., 70 ref.

AL sl/en

AB *Saccharomyces cerevisiae* is well known for its high level of conservation of cell processes between yeasts and higher organisms, and that is the main reason why yeast was used as a model organism in the study of medical substances; extract of *Mandragora officinarum*. Yeast cells were treated with different samples (wine/mandrake extract in wine/water/control solution with standards scopolamine and atropine). Proteins of yeast cell extract were analyzed with 2-D electrophoresis and protein profiles were compared using 2-D Dymension software. When 0,5 mL of sample was added to 50 mL of yeast suspension in phosphate buffer (concentration $1 \cdot 10^8$ cells/mL) as well in the case of 5-mL addition of sample to 45 mL of yeast suspension in phosphate buffer, significant changes in protein expression were observed, as a consequence of mandrake extract action. Mandrake extract compared to control (water) showed the contrary effect on increase/reduction of 2-D spot intensity as was observed at wine compared to control. Comparison of protein profiles of yeast cells, treated with mandrake extract and those treated with scopolamine and atropine confirmed that synergistic effect of substances extracted from the mandrake might be the responsible for changes in protein expression rather than scopolamine and atropine alone. Results showed that yeast *S. cerevisiae* is useful model for study the influence of mandrake extract on proteome level.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
KAZALO OKRAJŠAV	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>Mandragora officinarum</i> IN IZVOR NJENEGA NENAVADNEGA IMENA.....	3
2.2 KLASIFIKACIJA NADLIŠČKA (<i>Mandragora officinarum</i>).....	5
2.3 KAJ O NADLIŠČKU PRAVI POLJUDNOZNANSTVENA LITERATURA	5
2.4 ZGODOVINA NADLIŠČKA IN VSEBNOST SEKUNDARNIH METABOLITOV	6
2.5 UPORABA NADLIŠČKA V MEDICINI.....	10
2.6 ZAKAJ RAZISKOVATI MEHANIZEM NADLIŠČKA?	13
2.7 PROTEOMIKA	14

2.8	SDS-PAGE	15
2.9	RAČUNALNIŠKA ANALIZA GELOV 2-D ELEKTROFOREZE	18
2.10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA PROUČEVANJE MEHANIZMA DELOVANJA ZDRAVILNIH UČINKOVIN	19
3	METODE DELA	22
3.1	PRIPRAVA INOKULUMA	23
3.1.1	Aerobna submerzna kultivacija kvasovke na stresalniku	24
3.2	ŠTETJE CELIC	24
3.3	TRETIRANJE CELIC KVASOVKE Z VZORCI	24
3.4	PRIPRAVA VZORCEV	25
3.5	DOLOČANJE ŽIVOSTI CELIC	26
3.6	ANALIZA PROTEINOV CELIČNEGA EKSTRAKTA	27
3.7	DOLOČANJE KONCENTRACIJ PROTEINOV V CELIČNEM EKSTRAKTU	28
3.8	DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA	29
3.8.1	Rehidracija trakov	29
3.8.2	Izoelektrično fokusiranje	31
3.8.3	Vlivanje gelov	32
3.8.4	Uravnoteženje trakov	33
3.8.5	Prenos trakov na ločilni gel	34
3.8.6	SDS-PAGE	35
3.8.7	Barvanje gelov	36

3.8.8	Dokumentacija gelov in obdelava slik	36
4	REZULTATI.....	38
4.1	TRETIRANJE KVASOVK Z VZORCI.....	38
4.2	ANALIZA CELIČNIH PROTEINOV Z 2-D ELEKTROFOREZO.....	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1	RAZPRAVA.....	49
5.2	SKLEPI.....	52
6	POVZETEK.....	53
7	VIRI	55
	ZAHVALA	62
	PRILOGE.....	63

KAZALO SLIK

Slika 1: A mandrake in vine bondage (A mandrake in vine bondage, 2008).....	4
Slika 2 : <i>Mandragora officinarum</i> var. <i>Vernalis</i> (Alchemy works, 2004).....	5
Slika 3: Skica sinteze tropanskih alkaloidov, atropina in skopolamina (Dräger B., 2006)...	9
Slika 4: Powerful grace lies in herbs and plant (Poweful grace lies in herbs and plant, 1998).....	12
Slika 5: Hodogram poteka poskusa	22
Slika 6: Dvojna mreža na Bürker-Türkovi števni komori	24
Slika 7: Vpliv vode (H ₂ O), ekstrakta nadliščka v vinu (05VM) in vina (05V), v dodatku 0,5 mL, na živost kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	38
Slika 8: Vpliv vode (H ₂ O), ekstrakta nadliščka v vinu (5VM) in vina (5VM), v dodatku 5 ml, na živost kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	39
Slika 9: Prikaz računalniške obdelave 2-D lis	40
Slika 10: Vpliv vina (A), ekstrakta nadliščka v vinu (B) in vode (C) na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (dodatek 0,5 mL)	41
Slika 11: Prikaz normaliziranih volumnov 2D-lise št. 1 kot posledica različnega vpliva vzorcev 05V, H ₂ O in 05VM na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	42
Slika 12: Vpliv vina (A), ekstrakta nadliščka v vinu (B) in vode (C) na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (dodatek 5 ml)	43
Slika 13: Prika normaliziranih volumnom 2D-lis št. 1(A), 2(B), 3(C) in 4 (D) kot posledica različnega vpliva vzorcev 5V, H ₂ O in 5VM na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ...	44
Slika 14: Vpliv vode (E), ekstrakta nadliščka v vodi (EM) in standardoma skopolamina in atropina v vodi (EAS),v dodatku 0,5 ml, na živost kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	46

Slika 15: Vpliv vode (A), ekstrakta nadliščka v vodi (B) in standardov skopolamina in atropina (C) na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (dodatek 0,5 ml)	47
Slika 16: Prikaz normaliziranih volumnov 2D-lise št. 1 kot posledica različnega vpliva vzorcev E, EM in EAS na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	48
Slika 17: Prikaz normaliziranih volumnov 2D-lise št. 2 kot posledica različnega vpliva vzorcev E, EM in EAS na proteinski profil kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priprava trdnega YEPD gojišča.....	23
Preglednica 2: Priprava tekočega YEPD gojišča.....	23
Preglednica 3: Priprava 50 mM, pH 7 fosfatnega pufra.....	25
Preglednica 4: Priprava ekstrakcijskega pufra.....	27
Preglednica 5: Priprava 1M Tris-HCl pufra, pH 8,0	28
Preglednica 6: Priprava rehidracijskega pufra.....	31
Preglednica 7: Priprava 12 % poliakrilamidnega gela.....	32
Preglednica 8: Priprava 10 % (w/v) raztopine SDS	33
Preglednica 9: Priprava 10 % (w/v) raztopine APS	33
Preglednica 10: Priprava 1,5 M Tris-HCl, pH 8,0.....	33
Preglednica 11: Priprava osnovne raztopine ravnotežnega pufra.....	34
Preglednica 12: Priprava pufra za uravnoteženje I.....	34
Preglednica 13: Priprava pufra za uravnoteženje II.....	34
Preglednica 14: Priprava 1 % agarozne raztopine.....	35
Preglednica 15: Priprava 5×SDS elektroforetskega pufra.....	35
Preglednica 16: Priprava 1×SDS elektroforetskega pufra.....	35
Preglednica 17: Postopek barvanja gelov s fluorescentnim barvilom Sypro ruby	36

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

Priloga B: rastna krivulja (aerobna submerzna kultivacija kvasovke *saccharomyces cerevisiae* na stresalniku – vd = 100 ml, T 28°C, 200 obrt./min)

Priloga C: Prikaz razmerja normaliziranih volumnov ter normaliziranih volumnov izbranih 2-D lis pri primerjavi proteinskih profilov kvasovke *S. cerevisiae* tretirane z vodo (H₂O), vinom (05V) in ekstraktom nadliščka v vinu (05VM) (dodatek 0,5 mL)

Priloga D: Prikaz normaliziranih volumnov ter volumnov izbranih 2D lis pri primerjavi proteinskih profilov kvasovke *S. cerevisiae* tretirane z vodo (H₂O), vinom (5V) in ekstraktom nadliščka v vinu (5VM) (dodatek 5 ml)

Priloga E: Prikaz normaliziranih volumnov ter volumnov izbranih 2D lis pri primerjavi proteinskih profilov kvasovke *S. cerevisiae* tretirane z vodo (05E), ekstraktom nadliščka v vodi (05EM) in standardoma skopolamina in atropina v vodi (05EAS) (dodatek 0,5 ml)

KAZALO OKRAJŠAV

05V	0,5 mL vina + 4,5 mL ddH ₂ O
05VM	0,5 mL ekstrakta nadliščka v vinu + ddH ₂ O
5V	5 mL vina
5VM	5 mL ekstrakta nadliščka v vinu
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin
CHAPS	3-(3-kloroamidopropil)dimetilamoninio-1-propansulfonat
ddH ₂ O	bidestilirana voda
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
E	0,5 mL kontrolne raztopine + 4,5 mL ddH ₂ O
EAS	0,5 mL ekstrakta nadliščka v kontrolni raztopini + 4,5 mL ddH ₂ O
EM	0,5 mL kontrolne raztopine + standardni raztopini skopolamina in atropina
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognize As Safe
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPG	imobiliziran pH gradient
JAA	jodacetamid
Mr	molekulska masa
MS	masna spektometrija
OD	optična gostota
pI	izoelektrična točka
R	razmerje normaliziranih volumnov
RFU	(angl. relative fluorescence unit)
SDS	sodijum dodecil sulfat

SDS-PAGE	sodijum-dodecil-sulfatna poliakrilamidna elektroforeza
TEMED	tetrametiletilendiamin
YEPD	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

1 UVOD

Z nadliščkom (*Mandragora officinarum*), iz družine *Solanaceae*, so povezani številni magični obredi znani že iz obdobja antike, v zgodovini medicine pa je poznana predvsem kot močan narkotik ter analgetik. Različni deli rastline vsebujejo med 0,3 in 0,4 % tropanskih alkaloidov, kot so hiosciamin, hioscin (skopolamin), atropin. Največkrat v literaturi zasledimo uporabo ekstraktov korena nadliščka namočenega v vinu (v kirurgiji ter pri pripravi čarobnih napojev). Viri omenjajo tudi uporabnost plodov nadliščka, vendar redkeje. Z začetkom 19. stoletja so opustili uporabo nadliščka kot narkotika, zaradi nestandardiziranih koncentracij vsebnosti atropina in hioscina, še vedno pa ostajajo nepojasneni zdravilni učinki te »magične« rastline (Ramoutsaki, 2002).

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Kot primeren model za odkrivanje tarč delovanja zdravilnih učinkovin ter študija celične biologije se je izkazala kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* je enocelični, eukariotski organizem, za katerega je značilna visoka stopnja ohranjenosti genov med človekom in kvasovko, veliko število ortolognih proteinov med omenjenima organizmoma, enostavna genska manipulacija, enostavno vzdrževanje in namnoževanje ter visoka stopnja ohranjenosti celičnih procesov (celični metabolizem ter celični cikel) med kvasovkami ter višje razvitimi organizmi.

Mehanizmi delovanja ekstrakta korena *Mandragora officinarum* v celicah niso znani. S poznavanjem proteinov, ki so tarče delovanja ekstrakta, bomo pridobili boljši vpogled v razumevanje še nepojasnjenih zdravilnih učinkov te rastline.

Delovne hipoteze:

- ❖ Dodatek ekstrakta korenae rastline *Mandragora officinarum* celicam kvasovke bo povzročil spremembo proteinskega profila celičnega ekstrakta, tako v smeri represije kot tudi indukcije sinteze.

- ❖ Z analizo proteinskega profila kvasovke tretirane z ekstrakti korena *Mandragora officinarum* dobimo vpogled v boljše razumevanje mehanizma delovanja ekstrahiranih zdravilnih učinkovin iz omenjene rastline.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Mandragora officinarum* IN IZVOR NJENEGA NENAVADNEGA IMENA

Mnogo stoletij je rastlina z imenom nadlišček (*Mandragora officinarum*) veljala za najpomembnejše medicinsko zelišče, kateremu so pripisovali visoko kulturološko vrednost. Antropomorfološko oblikovan koren nadliščka je odigral izredno pomembno vlogo v zgodovini evropejcev. Z nadliščkom so povezani številni miti in legende, rastlina kar kliče po misterioznosti, mračnosti, celo grozi (Carter, 2003). Glede na številčno zastopanost rastline na različnih področjih medicine, bi lahko pričakovali, da je bilo v povezavi z nadliščkom narejenih že veliko fitokemijskih in farmakoloških študij, vendar pa temu ni tako. V povezavi z aktivnimi substancami nadliščka je bilo narejenih zelo malo študij, ki nebi pokrivala zgolj področja alkaloidov. Identifikacija, mehanizma delovanja, tako mogočne »magije« je nadvse zahtevna, saj obstaja samo v prepričanju ljudi, farmakoloških študij, ki bi pojasnile »misteriozne« učinke delovanja, pa ni (Hanuš, 2006).

Pradomovina nadliščka je današnji Izrael. Od tam se je rastlina razširila po Egiptu, Grčiji in dalje na mediteran, na vzhodu pa vse do Himalaje. Med redke rastline ga prištevajo tudi na Hrvaškem kjer ga najdemo v okolici Dubrovnika (Grlić, 1989).

Nadlišček je med številnimi čarovniškimi rastlinami najbolj tipičen predstavnik »magičnih moči«. Dokaze o lajšanju bolečin za medicinske in kirurške potrebe najdemo že v obdobju Rimljanov in Bizantincev (2. stol. pr. naš. št.). Znanstveniki iz tega obdobja so rastline *Mandragora officinarum*, *Hyoscyamos niger* in *Atropa belladonna*, vse prištevamo v družino *Solanaceae*, poimenovali za najpomembnejša zelišča pri lajšanju bolečin (Ramoutsaki in sod. 2002).

Družino *Solanaceae* prištevamo med najpomembnejše skupine rastlin za človeka. Številne vrste iz družine *Solanaceae* človek uporablja v svoji prehrani (krompir, paradižnik), kot drogo (tobak, nadlišček, volčja češnja) ter kot okrasne rastline. Družina *Solanaceae* šteje 90 rodov ter med 3000 in 4000 vrst. Člani družine so nadvse raznoliki, tako po habitatu katerega naseljujejo (sem prištevamo tako drevesa kot sezonska zelišča) kot po morfologiji s številnimi variacijami značilnosti tako cvetov kot plodov (Hanuš in sod., 2005).

Med vsemi člani družine *Solanaceae* ima nadlišček najbolj nenavadno zgodovino. Poznavanje zastrupljajočih moči nadliščka sega leta nazaj v zgodovino, njegova slava pa je vplivala na celotno evropsko civilizacijo. Grška beseda te rastline, »mandragoras«, najverjetneje izhaja iz zgodovinskega imena rastline, s katerim so jo poimenovali že perzijski zdravniki ter izhaja iz besedne zveze »medrum gija«, kar v prevodu pomeni rastlina, (Von Hintzenstern, 1989; Bowes, 1989) oz. kot navaja Hanuš (2005) iz dveh grških besed, ki v prevodu pomenita »škodljiv za živino/ljudi«, v sumerščini pa naj bi besedna zveza nam-tar-agar pomenila demonska/usodna rastlina polj (Von Hintzenstern, 1989). Angleško ime nadliščka, »mandrake«, najbrž izvira iz srednjeveške angleščine oz. nizozemščine in nosi dvojni pomen. Iz navidezne podobnosti korena nadliščka človeškemu telesu najbrž izvira prvi koren imena mandragora, »man« (moški/človek), koren »drake«, ki izvira iz angleške besede »dragon«, pa oriše magične lastnosti povezane s to rastlino (Couper, 1989). Latinska oblika imena, *Madragora officinarum*, je bila ustanovljena vsaj v dobi Shakespearja, če ne že prej, saj jo slavni pisec omenja v svojih delih Otelija ter predvsem v delu Romeo in Julija, kjer opisuje krik nadliščka ob izkoreninjenju ter ljudi, ki jih je krik nadliščka obsedel z norostjo (Lee, 2006).



Slika 1: A mandrake in vine bondage (A mandrake in vine bondage, 2008)

2.2 KLASIFIKACIJA NADLIŠČKA (*Mandragora officinarum*)

Nadlišček je trajnica, ki izvira iz južnega mediterana. Uvrščajo jo v družino razhudnikov (*Solanaceae*), red *Solanales*, razred dvokaličnic (*Magnoliopsida*), deblo kritosemenk (*Magnoliophyta*), kraljestvo rastlin (*Plantae*). Pristna je zgolj toplim predelom srednjega vzhoda in je nenavadno redka v preostalih predelih sveta. Ima velik, mesnato rjavkast glavni koren, ki je močno razvejan. Za nadlišček so značilni preprosti, značilno dolgi temno zeleni listi in posamični krpasto oblikovani cvetovi, ki so bodisi rumenkasti bodisi škrlatni. Plodovi, ki ne presegajo velikosti sadeža slive, v obliki bobkov, se nahajajo na dolgih pecljih, ki izhajajo iz prizemne rozete listov, so rumeno obarvani, aromatični in strupeni (Waniakowa, 2007). Zaradi svojih plodov, ki spominjajo na majhna jabolka je bil ponekod nadlišček znan tudi po imenom hudičevo jabolko (Lee, 2006).



Slika 2 : *Mandragora officinarum* var. *Vernalis* (Alchemy works, 2004)

2.3 KAJ O NADLIŠČKU PRAVI POLJUDNOZNANSTVENA LITERATURA

Valvasor je leta 1689 napisal: »Če se izvrši polet čarovnic na rajanje čisto zares ali le iz domišljije, o tem se učenjaki še prepirajo...In mnogo zelo znanih in visoko učenih peres

(piscev) stoji na tej strani, namreč da gre za to, da je prazna domišljija goljufala takšne čarovnice. Sem sodijo Wierus, Godelmannus, Agrippa, Duarenus, Aerodius, Philippus, Melanchton, Alciatus, Joannes, Salisburiensis, Philippus, Camerarius Longinus in poleg drugih tudi Joannes Babtista Porta.«

Po piscu Joannes-u Babtista Porta Valvasor povzema zgodbo o tem, kako se je žena, potem ko so morali ljudje oditi iz njene sobe, namazala z nekim mazilom. Tisti zunaj sobe so ženo vseeno na skrivaj opazovali skozi špranjo. Potem, ko se je namazala s čarovniško mažo, naj bi padla na tla in zaspala tako neobudljivo, da ni občutila na sebi najmanjše dojemljivosti za kako bolečino, čeprav so jo nato, ko so odprli vrata, krepko obdelali s korobači. Ko se je spet zbudila, je pripovedovala takšne pustolovske dogodivščine, kako da je tako zelo daleč in to celo v kratkem času potovala prek dežel in voda, hribov in dolin in kaj se je tam daleč godilo. Čeprav so ji navzoči zagotovili, da se njeno telo sploh ni premaknilo z mesta in je bila podoba tega dovolj razvidna iz modric, ki jih je prejela, je vseeno togo ostala pri svoji domišljiji.

Za sestavo teh mazil srečamo v literaturi od 1493 pa do 1721 podatke o pripravkih iz razhudnikov, plodov ali korenin volčje češnje (*Atropa belladonna*), semen črnega zobnika (*Hyoscyamus niger*), iz grenkoslada (*Solanum dulcamara*), pasjega zelišča (*Solanum nigrum*), korena nadliščka (*Mandragora officinarum*) (Bohinc, 1992).

Leta 1555 poroča Andreas de Laguna, kako da korenine volčje češnje uspavajo in povzročajo prijetne privide, podobno bo, tako meni, z mažo čarovnic, »ki povroča izredno hud mraz«; to se je v jeziku tedanje »farmakologije«, podedovane po Galenu, bralo kot omamljajoči (narkotični) učinek (Bohinc, 1992).

Med zelmi omenjenega tedaj oficinalnega mazila in maž, ki so jih pripravljale čarovnice same, srečamo v prvi vrsti razhudnikovke (Bohinc, 1992).

V raziskovalne namene je preiskušal vpliv čarovniških maž na sebi že Pierre Gassendi (1592-1655), v poskusih na sebi pa sta privide letenje dokazala tudi etnolog Erich Peuckert in Siegbert Ferckel (Bohinc, 1992).

2.4 ZGODOVINA NADLIŠČKA IN VSEBNOST SEKUNDARNIH METABOLITOV

Prve reference o tej »čarovniški« rastlini zasledimo že v Bibliji (Stara zaveza), v prvi Mojzesovi knjigi, Biblijska »ljubavna jabolka« so namreč plodovi nadliščka, omenjajo pa se

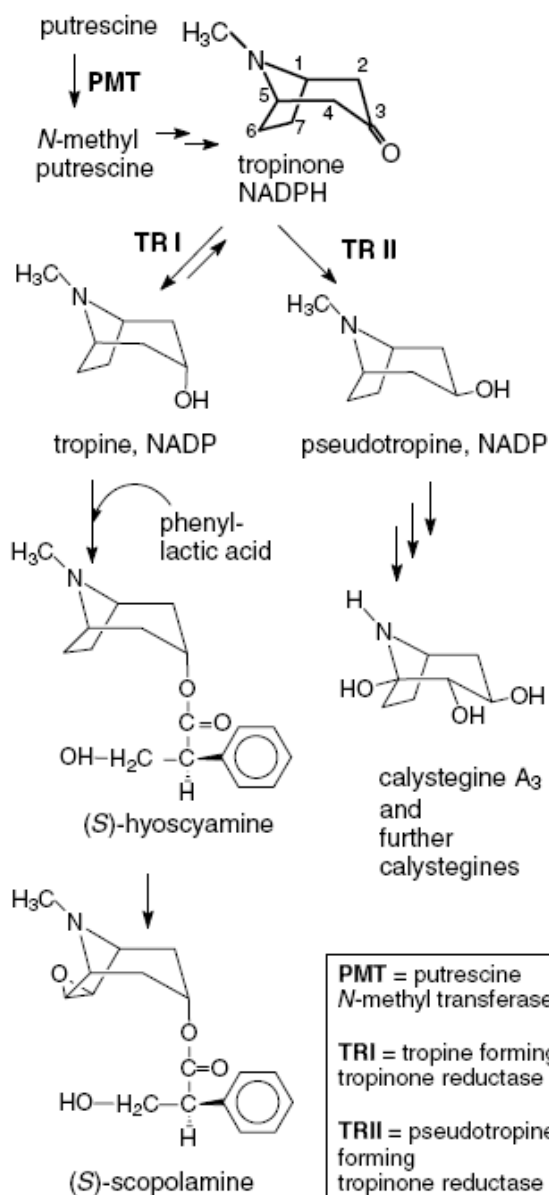
kot sredstvo za uspavanje, zdravilo za neplodnost, pa tudi kot afrodiziak (Bohinc, 1992). Zapise o uporabi nadliščka najdemo tudi že med starodavnimi vzhodnjaškimi rokopisi. Poslikave iz egipčanskih grobnic prikazujejo uporabo nadliščka med obredi zdravljenja, ime pa se pojavi tudi v najstarejšem medicinskem dokumentu, Eberjevem papirusu izpred 3500 leti (Waniakowa, 2007). Rastlina je bila široko uporabljena že v času Grkov ter Rimljanov, v srednjem veku pa tudi v obdobju renesance. Že takrat je bila znana po svojih magičnih, afrodizičnih, zdravilnih, halucinogenih prav tako pa tudi strupenih lastnostih (Hanuš, 2006).

Da bi bilo nabiranje smrtonosne, magične rastline varno, so različne etnične skupine razvile številne rituale, ki naj bi prispevali k varnemu nabiranju. V srednjeveškem času so vraževerna prepričanja o obredih nabiranja nadliščka ovrgli, še vedno pa je nadlišček zaradi svojega močnega anestetskega učinka ostal v uporabi kot sestavni del mešanice uspavalnih sredstev, ki so jih nanесли na gazo pred izvedbo operacije. Rastlina je ostala v medicinski uporabi vse do 17. stoletja, sčasoma pa so dušikov oksid, eter in kloroform prevzeli »skrivnostne« učinke nadliščka. Kljub vsemu zgodba o nadliščku ostaja ena fascinantnejših zgod iz zgodovine medicine. Zanimajo je, da je bil pri Židih poudarek na moči rastline in na zmožnosti oploditve, ni pa govora o narkotičnih sposobnostih. V antični Grčiji včasih plodove nadliščka omenjajo z imenom »jabolka ljubezni«, kontrastno z Arabci, ki so ga poimenovali »hudičevo jabolko« torej tisto jabolko, ki ima sposobnost zanetiti strast. V soseščini gora Lebanona pa so nekatera arabska plemena rastlino imenovala »Baid-ul-Jinn« ali z literarnim imenom jajca Genii-ja, kar je tudi ena izmed prvih referenc, ki pripisujejo rastlini magične lastnosti (Lee, 2006).

Nadlišček vsebuje med 0,3 % in 0,4 % tropanskih alkaloidov kot so hiosciamin, hioscin (skopolamin) ter atropin (Nutton, 1996; Von Hintzenstern, 1989). Tropanski alkaloidi sodijo med najstarejša zdravila v medicini. So močni centralni in periferni kompetitivni antagonisti acetilholina. Na vegetativni živčni sistem delujejo tako, da izpodrinejo nevrottransmitter acetilholin na živčnih receptorjih. So tipični parasimpatolitiki. Atropin, hiosciamin in skopolamin zdravniki anesteziisti dodatno uporabljajo pri eterski narkozi, ker preprečujejo nastajanje sluzi. Atropin in skopolamin se uporabljata za lajšanje neugodja pri težavah urinarnega trakta, za spodbujanje srca pri bolnikih, ki imajo nenormalno nizek srčni utrip ter pri lajšanju predmenstrualnega sindroma (Arro in sod., 2007). Halucinogeni delujejo na živčni sistem tako, da na specifičen način spremenijo dožemanje realnosti, ustvarjajo iluzije, bleščeče in sijajne vizije, slušne, taktilne in druge halucinacije, spremenijo naše dožemanje prostora in časa, doživljaje podobno sanjam; v bistvu neke vrste predhodno in zavestno doživljanje

duševne motenosti (neke vrste shizofrenija). Ali drugače povedano, doživljamo stanja spremenjene zavesti (Ramoutsaki in sod., 2002).

Atropin, hiosciamin in skopolamin delujejo na parasimpatični živčni sistem. So kompetitivni antagonisti acetilholina in drugih muskarinskih antagonistov. Skopolamin ima močnejši učinek pri nižjih terapevtskih dozah, povzroča manj stranskih učinkov in se torej uporablja pri zdravljenju morske bolezni ter pri proizvodnji derivatov zdravilnih učinkovin za lajšanje želodčnih težav. Alkaloida hiosciamin in skopolamin imata oba (+) ter (-) sušno obliko, toda samo (-)-hiosciamin in (-)-skopolamin sta biološko aktivna. Atropin je racemna mešanica (-)-in (+)-hiosciamina, do racemizacije pa navadno pride tekom izolacije hiosciamina iz rastline. Kemijski sintezi skopolamina ter hiosciamina sta se izkazali za izredno zahtevni ter ekonomsko izvedljivi, tako da se oba alkaloida pridobivata izključno s pomočjo rastlin. Trenutno sta najpomembnejša komercialna vira alkaloidov *Dubosia* hibrid, ki ga večinoma vzgajajo v Avstraliji ter *Atropa belladonna* L. Ocenjujejo, da so potrebe v svetu po skopolaminu 10-krat večje od potreb (-)-hiosciamina ter atropina skupaj. Cena za čisto substanco skopolamina je cca. 27 \$/g (Arroo in sod., 2007).



Slika 3: Skica sinteze tropanskih alkaloidov, atropina in skopolamina (Dräger B., 2006)

Tropanski alkaloidi imajo pirolidinski in piperidinski obroč, ki si delita dušikov ter ogljikov atom. Tropanska alkaloida, hiosciamin in skopolamin, sta estra tropične kisline ter tropina, in tropične kisline ter skopina. Biciklični tropanski obroč izvira iz L-ornitina in L-arginina preko tropinona, medtem ko se tropična kislina sintetizira preko fenilalanina. Tropinon se stereospecifično reducira, tako da tvori bodisi tropin, ki se inkorporira v hiosciamin, bodisi v pseudotropin, za katerega predpostavljajo, da je prekurzor kalistegninov, nedavno odkrite nove skupine tropanskih alkaloidov (slika 3). Hiosciamin se konvertira v skopolamin preko intermediata 6β-hidroksihiosciamina (Arroo in sod., 2007).

2.5 UPORABA NADLIŠČKA V MEDICINI

Pri Grkih že prvi zapisi o nadliščku govorijo o njegovih narkotičnih učinkih. Theophrastus je v prvi grški monografiji o rastlinah, leta 230 pred našim štetjem opisal nadlišček kot suvereno zdravilo za udnico, šen, nespečnost in zanimivo, podobno kot hebrejci tudi kot ljubezenski napoj. »The Codex Neapolitanus« je eden izmed prvih rokopisov nastalih po tradiciji *Materia Medica*, ki predstavljal vodilno farmakološko delo v grško-rimskem obdobju, napisal pa ga je grški kirurg Pedanius Dioscorides v 1. stoletju pred našim štetjem (Peduto, 2001). Dioscorides je podrobno opisal nadlišček v svojem delu *Grška zelišča*. Tekom let so nadliščku pripisovali čudovito, mistično auro, Dioscorides pa je bil prvi, ki je v svoji knjigi uporabil besedo anestezija. Definiral jo je kot odsotnost zavesti, kot jo razumemo še danes (Hanuš in sod., 2005). Hipokrat, oče medicine, je 400 let pred našim štetjem trdil, da že majhna doza v vinu namočenega korena nadliščka, manjša od običajno popite količine, občasno povzroča blodnje, močno depresijo in bojazen, Aristotel pa opisuje nadlišček kot dragoceno uspavalno sredstvo, skupaj z preostalimi rastlinami kot so mak (*Papaver species*) in navadna grašica (*Lolium temulentum*) (Lee, 2006).

Od leta 500 pred našim štetjem naprej so zdravniki in filozofi, ki so migrirali med Grčijo in Rimom s seboj prinesli znanje, ki je bilo sprejeto v zgodnjih disciplinah Asklepios-a (tudi Theophrastus-a in Dioscorides-a). Rimski avtor Pliny starejši je poleg že znanih učinkov nadliščka v svojih delih omenjal tudi uporabnost rastline pri vnetju oči. Rimljani so bili mnenja, da je rastlina uporabna tako v medicinske kot v vojaške namene. Kartaški general Hanibal naj bi porazil afriške upornike s taktiko navidezne predaje, nato pa naj bi na bojišču pustil kozarce vina obogatene z ekstraktom nadliščka. Uporniki naj bi po zaužitju vina postali zaspani ali celo otrpli, Rimljani pa naj bi jih nato z lahkoto premagali. Podobna zgodba kroži tudi o Juliju Cezarju, ki naj bi uporabil podobno strategijo pri pobegu iz ujetništva, v katerem so ga držali Siciljanci (Lee, 2006).

Med kmeti je imel nadlišček ljubeče-sovražen odnos. Na eni strani so si na vso moč prizadevali pridobiti koren rastline, saj naj bi si s tem pridobili moč, vpliv in bogastvo, po drugi strani pa so se nerazumno bali postopka izkoreninjenja, da se ne bi med samim izkopom zgrudili mrtvi oz., da jih ne bi obsedel zli satanistični duh, ki bi jih prisilil v nepredstavljive grehe in jih obsodil na peklenški ogenj. Satanistično moč je bilo mogoče premagati le z močnejšo magijo in ravno zaradi tega so se razvili obredi nabiranja rastline. Rastlino naj bi iz zemlje izruvali tako, da so na steblo privezali lačnega psa, in mu na nedosegljivi razdalji

postavili kos mesa. Zli duh, naj bi tako med izkoreninjanjem nadliščka obsedel psa in ga pogubil. Znano je tudi, da naj bi se nabiralci nadliščka zbrali ob petkih in si ušesa zamašili z voskom, saj naj bi nadlišček med izkopom izustil stahotne krike, zaradi katerih naj bi človek ponorel. Eden izmed ritualov je bil tudi ta, da so na steblo rastline obesili križ, da jih med izkopom nebi obsedel zli duh. Priporočljivi del dneva za izkop je bilo jutro, takrat naj bi rastlina izločala največ magičnih substanc, poleg tega pa je takrat njen čuvaj, zli duh, spal. Priporočljiv letni čas za izkop naj bi na podlagi zapisov bilo zgodnje poletje (Lee, 1999). Mnoge druge rastline, katerim so pripisovali magične učinke so imele podobne obrede nabiranja, vendar ti običajno niso vključevali psa, kot je to znano za nadlišček. Povzeto po starogrškem filozofu Teofrastu naj izkoreninjenje rastline nebi predstavljajo nobene nevarnosti, če se je predhodno okoli nje trikrat zaokrožilo z mečem v roki, pri tem pa je bilo potrebno z obrazom gledati v vzhajajoče sonce; istočasno je pomočnik nabiralca plesal okoli nadliščka ter prepeval ljubezenske pesmi (Grlić, 1989).



Slika 4: Powerful grace lies in herbs and plant (Poweful grace lies in herbs and plant, 1998)

Pravtako naj bi osušeni koren nadliščka številni slavni ljudje iz zgodovine uporabljali kot amulet ne samo zaradi magičnega delovanja in velike strupenosti, ampak tudi zaradi svoje oblike, podobne človeškemu telesu. Pogosto so ljudje to obliko še izpopolnili z obrezovanjem. Da bi lastnikom amuleti prinesli srečo, so morali za njih skrbeti kot za kralje. Oblačili so jih v žamet in svilo, shranjevali so jih v majhnih kovčkih in redno vsak petek okopali v rdečem vinu. Če tega niso delali redno, jim je nadlišček začel povzročati nevšečnosti. Med privržence amuletov zgodovinski viri prištevajo tudi rimsko-nemškega carja Rudolf II in makedonskega vodjo Aleksandra Velikega (Waniakowa, 2007).

Med 15. in 18. stoletjem se je porodil nov mit, katerega zgodbe so krožile predvsem po Nemčiji in Avstriji. Mit pravi, da naj bi na mestu kjer so obesili kriminalca in ga pokopali

zacvetel nadlišček. Schmidel leta 1751 opiše:« Na mestu nog obešenca zacveti rastlina z rumenimi cvetovi, korenina rastline pa predstavlja človeško telo, od las do spolnih organov«. Te korenine so bile močno cenjene v Nemčiji, njihove vrednosti pa so bile napihnjene. Korenine so bile dobro znane pod imenom populacije Galgemannlein (»little gallowa man«). Obstajala so jasna navodila kako ravnati s temi »možički«, da bi ti prinesli bogastvo in plodnost, poleg tega pa naj bi odgovorili na vsako nanje naslovljeno vprašanje. Po smrti lastnika, naj bi se umetni človeček prenesl v roke najmlajšega sina. Tudi ta mit ima paralele pri tolmačanju nakaterih drugih rastlin, katerim so pripisovali magične lastnosti (Lee, 2006). V 16. in 17. stoletju je prišla nova doba racionalizma in razsvetlitve. Nabiranje nadliščka in njegova uporaba sta bili postavljeni pod vprašaj. Vraže so bile ovržene, terapijske indikacije pa so ostale. Nadliščka so v tem času priporočali kot uspavalno sredstvo, zdravilo proti bolečinam ter kot sredstvo za ublažitev ureznin in opeklin (Lee, 2006).

Z začetkom 19. stoletja so postali zdravniki in kirurgi nezadovoljni z nenadzorovanim učinkom uspavalnih spušev ter so pričeli z raziskovanjem novih anestetikov. Gibanje se je začelo s kemikom Jospho-om Priestley-em 1775. Bil je med prvimi, ki so izolirali dušikov oksid (smejalni plin), spodbudil pa je tudi interes za dietil estre ter kloroform. Ti trije hlapni anestetiki so se izkazali za zanesljivejše in predvsem varnejše od predhodno uporabljenih. Od leta 1900 naprej pa sta dobro karakterizirani in terapijsko uporabljeni substanci atropin in hioscin, ki sta tudi sestavni del tropanskih alkaloidov, ki jih najdemo v nadliščku (Lee, 2006).

2.6 ZAKAJ RAZISKOVATI MEHANIZEM NADLIŠČKA?

Delovanje mnogih v vsakdanji praksi uporabljenih zdravil ni popolnoma pojasnjeno, specifične tarče delovanje so še vedno neznanka. Aktivnosti zdravilnih učinkovin, ki ne delujejo na specifične tarčne molekule, se lahko kažejo v neželenih stranskih učinkih njihovega delovanja. To je pogosto značilnost zdravil, ki niso nikoli prišla na trg, saj niso zaključili kliničnih študij, posledično pa niso bili odobreni s strani FDA (DiMasi in sod., 2003). Stranski učinki omenjenih zdravilnih učinkovin so lahko včasih tudi koristni, kot se je to izkazalo pri viagri. Prvoten cilj delovanja omenjenega zdravila je bilo zdravljenje pljučne vazodilatacije z inhibicijo PDE5, za katero se je tekom kliničnih študij izkazalo, da pozitivno vpliva tudi na erektilno disfunkcijo. Ker so specifične tarče delovanja mnogih danes poznanih zdravilnih učinkovin še vedno neznane obstaja možnost, da bi v primeru poznavanja njihovih

aktivnosti lahko razložili danes slabo pojasnjene stranske učinke zdravilne substance in po možnosti celo predpostavili nove terapevtske lastnosti (Terrett in sod., 1996).

2.7 PROTEOMIKA

Postopki lansiranja novih zdravilnih učinkovin na trg vključujejo identifikacijo bioloških tarč ter identifikacijo poti, ki vzpodbujajo/inhibirajo delovanje tarč (Zhu in Sbyder, 2002). Postopki uveljavitve nove zdravilne učinkovine so dolgotrajni in dragi, 10 - 15 let s stroški razvoja ocenjenimi na 800 milijonov ameriških dolarjev (DiMasi in sod., 2003), obenem pa samo 10 % vseh raziskovalnih študij, ki vstopijo v klinično fazo, FDA odobri za prodajo na trgu (DiMasi, 2001). Odgovor na problem dolgotrajnega ter dragega razvoja novih zdravilnih učinkovin ponuja proteomika. Nosilci funkcij vsake žive celice so proteini (Lubec in sod., 2003), fiziološko stanje celic se torej odraža v njihovi proteinski sestavi. Proteini izgrajujejo naše celične in izvenselične strukture, skrbijo za posredovanje sporočil (rastni dejavniki, hormoni, receptorji, citosolni in jedrni proteini), omogočajo transport hranil in metabolitov po krvi, v celice in v celicah, omogočajo metabolizem (encimske reakcije), branijo oz. ščitijo organizem (protitelesa, dejavniki strjevanja krvi) in uravnavajo izražanje genov. Zato menimo, da je proteom pravi izraz fiziologije celice v njenih fizioloških oz. patofizioloških razmerah, saj pomeni trenutno (v trenutnih razmerah) celokupno vsebnost vseh vrst proteinov v celici (Komel in sod., 2008). Proteinski profil celičnega sistema je dinamičen. Vseskozi se spreminja in je odvisen od fiziološkega in patološkega stanja celice (Križaj, 2008). Lahko bi rekli, da za posamezen organizem obstaja samo en genom in pa neskočno število različnih proteomov, ki so posledica različnega izražanja proteinov genoma v odvisnosti od časa ter pogojev. Proteom torej ne predstavlja zgolj zbirke proteinov, ki jih kodira genom posameznega organizma, temveč tudi podatke o izražanju proteinov pri določenih pogojih (López, 2006). Za popoln opis delovanje neke celice, tkiva ali pa celotnega organizma je torej potrebno poznati vse igralce (proteine), njihove vloge (encimske aktivnosti), postavitve na »odru« (lokalizacijo), »dialoge« med njimi (interakcije) in to v vsakem trenutku. Da bi lahko raziskali proteine posameznega organizma je nujno potrebno analizirati celoten proteom preiskovanega organizma. Proteom je definiran kot skupek vseh proteinov, ki se prepišejo iz določenega genoma in je kot fotografski posnetek izraženih proteinov v točno določenem trenutku ter pri specifičnih pogojih (Wasinger in sod., 1995). Proteomika je veda, ki se ukvarja z raziskavami proteomov, vendar v razširjenem pomenu tudi z obsežnimi raziskavami zgradbe in funkcije posameznih proteinov proteoma ter njihove medsebojne (strukturne in

funkcijske) povezanosti (Komel in sod., 2008). Omogoča kvantitativno analizo izraženih proteinov ter sprememb proteinov kot posledico bioloških motenj, ki se odražajo kot posttranslacijske modifikacije in prerazporeditve specifičnih proteinov znotraj celice (Anderson N.L. in Anderson N.G., 1998).

Proteomiko lahko vključimo v postopke odkrivanja novih zdravilnih učinkovin že v zgodnjih fazah razvoja pri identifikaciji tarč delovanja in ovrednotenju samega vpliva na tarčo. Področje apliciranja 2-D elektroforezne metode zajema področja raziskovanja zdravilnih učinkovin, diagnosticiranja zdravilnih učinkovin, terapije, mikrobiologije, biokemije, itd. (Auerbach in sod., 2005).

Analiza proteoma je tehnični iziv zaradi števila različnih izraženih proteinov, v določenem času pri določenih bioloških pogojih, kar številčno pomeni tudi več tisoč različnih proteinov pri prokariotskih organizmih ter vsaj 10,000 pri eukariotskih celičnih ekstraktih (López, 2006).

Tipičen proteomski poskus vključuje pripravo proteinskih vzorcev, pri katerih lahko nato opazujemo spremembo v izražanju proteinov sledi pa identifikacija specifičnih proteinov. Vodilna tehnologija za separacijo proteinov, ki je v uporabi že nekaj desetletij je dvodimenzionalna SDS-PAGE elektroforeza (VanBogelen in sod., 1999).

2.8 SDS-PAGE

2-D elektroforeza z imobiliziranim pH gradientom v kombinaciji z identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo (MS) predstavlja gonilni člen proteomike. Kljub obetavnim, alternativnim tehnologijam (tehnologija multidimenzionalne identifikacije proteinov, stabilno označevanje izotopov, proteinske in protitelesne mreže), ki so se pojavile pred kratkim, ostaja 2-D elektroforeza zaenkrat edina tehnika, ki jo lahko rutinsko izvajamo pri vzporednih kvantitativnih ekspresijah profila velikih setov kompleksnih proteinskih mešanic, kot so npr. celotni celični lizati (Görg in sod., 2004; Rabilloud in sod., 2002). 2-D elektroforeza ločuje proteine na osnovi dveh med seboj neodvisnih parametrov, izoelektrične točke (pI) proteinov v prvi dimenziji ter molekulske mase (Mr) v drugi dimenziji, s sklopitvijo izoelektričnega fokusiranja (IEF) in sodijum-dodecil-sulfatne poliakrilamidne elektroforeze (SDS-PAGE) (O'Farrell, 1975). 2-D elektroforeza omogoča ločitev kompleksne mešanice proteinov glede na njihovo izoelektrično točko, molekulsko maso ter relativno zastopanost v posameznem

vzorcu, obenem pa s takšno razčlenitvijo proteinov pridobimo podatke tudi o nivoju izražanja proteinov, o izooblikah ter posttranslacijskih modifikacijah, skratka celostno proteinsko mapo (Celis in Gromov, 1999). Današnja tehnologija 2-D elektroforeze z IPG stripi (Görg in sod., 2000; Blomberg in sod., 1995) je premostila predhodne omejitve nosilnih amfolitov, na katerih je ne dolgo nazaj bazirala 2-D elektroforeza (O'Farrell, 1975), s tem pa omogočila ponovljivost poskusov ter olajšala samo izvedbo, izboljšala resolucijo ter ločitev močno alkalnih in bazičnih proteinov. V odvisnosti od uporabljene velikosti gela ter obsega pH gradienta, lahko z 2-D elektroforezo ločimo tudi do 5000 proteinov naenkrat (Corbett in sod., 1994).

Če povzamemo na kratko so glavne točke postopka 2-D elektroforeze sledeče:

- ❖ Priprava vzorca ter popolna raztopitev proteinov v vzorcu.
- ❖ Ločitev proteinov z 2-D elektroforezno metodo.
- ❖ Detekcija in kvantifikacija ločenih proteinov.
- ❖ Računalniška analiza vzorcev 2-D elektroforeze.
- ❖ Identifikacija in karakterizacija proteinov.
- ❖ Postavitev podatkovne baze 2-D elektroforeze (Görg in sod., 2004).

Da bi lahko v polni meri izkoristili vse prednosti visoko resolucijske metode 2-D elektroforeze, morajo biti proteini v vzorcu popolnoma denaturirani, razdruženi, reducirani ter popolnoma raztopljeni, da bi lahko dosegli popolno ločitev ter lahko z zagotovostjo trdili, da je vsaka posamezna 2-D elektroforetska lisa reprezentativna za individualen polipeptid. Ne obstaja ena sama, univerzalna metoda za pripravo vzorcev za analizo z 2-D elektroforezo. Kljub temu, da je bilo do danes objavljeno že veliko število protokolov, se moramo zavedati, da je potrebno protokole prilagoditi in optimizirati za vrsto vzorca, ki ga analiziramo (npr. različni sta pripravi vzorcev za mikrobne celice ter za sesalčja tkiva) kot tudi za vrsto proteinov, ki jih želimo proučiti (npr. topne citosolne proteine, netopne membranske proteine). Seveda obstaja nekaj splošnih priporočil za pripravo vzorca kot so: čim enostavnejša priprava vzorca z namenom povečanja ponovljivosti metode, minimalne

modifikacije proteinov tekom priprave vzorca, pomembna pa je tudi deaktivacija proteaznih encimov v vzorcu (Damerval in sod., 1986; Granzier in Wang, 1993). Trije glavni koraki pri pripravi vzorca so:

- ❖ razbijanje celic,
- ❖ odstranjevanje oz. deaktivacija motečih substanc iz vzorca,
- ❖ popolna raztopitev proteinov (Görg in sod., 2004).

Pri pripravi vzorcev je nadvse pomembno, da prav vsak individualen peptid denaturiramo in reduciramo ter prekinemo intramolekularne in intermolekularne interakcije ter popolnoma raztopimo proteine, pri tem pa ohranimo naravne lastnosti kot so celokupen naboj polipetida (Görg in sod., 2004).

Po zaključeni 2-D elektroforezi je potrebno proteine obarvati s specifičnimi metodami barvanja. Najpomembnejše lastnosti teh metod so:

- ❖ Močna občutljivost metode (nizek prag detekcije).
- ❖ Visok, lineren dinamičen razpon (za natančno kvantifikacijo).
- ❖ Ponovljivost.
- ❖ Kompatibilnost s postopki identifikacije proteinov po zaključku elektroforeze (masna spektrometrija npr.) (Görg in sod., 2004).

Trenutno žal še ne obstaja metoda, ki bi ugodila vsem tem zahtevam. Univerzalne metode barvanja proteinov vključujejo barvanje z anionskimi barvili (Coomassie Blue), negativno barvanje z kovinskimi kationi (cink imidazol), »Silver-staining«, fluorescentno barvanje oz. označevanje, označevanje z radioaktivnimi izotopi, fosforilacijsko barvanje (Görg in sod., 2004).

Najobetavnejše izmed barvil je na ruteinu bazirano barvilo SYPRO Ruby (Tannu in sod., 2006). Barvanje je dokončano v nekaj urah, v enem samem koraku, ki ga lahko z lahkoto automatiziramo. Spodnji nivo detekcije je 1-2 ng proteina/2-D elektroforetsko liso, lineri razpon za kvantifikacijo proteinov pa je za približno 3 razrede večji. Barvanje s SYPRO Ruby

je ekonomično, bazira na rutein II trisu, razvil pa ga je Rabillound s sodelavci (Rabillound, 1996; Rabillound, 2002).

Vizualizacija in kvantifikacija proteinov označenih s fluorescentnimi barvili je nadvse obetavna zaradi svojega širokega linearnega, dinamičnega razpona ($> 10^3$) ter relativno enostavne uporabe. Večina fluorescentnih barvil je kompatibilna z nadaljnimi postopki identifikacije proteinov, kot je npr. masna spektrometrija. Največjo oviro pri uporabi fluorescentnih barvil predstavlja nizka občutljivost v primerjavi z elektronsko detekcijo radioaktivno označenih proteinov, detektiramo lahko le proteine, ki so v celici izraženi v številu kopij, ki je večje od 10^3 kopij/celico. Nedavne proteomske študije so pokazale, da večina identificiranih proteinov predstavlja močno zastopane »housekeeping« proteine, ki so v celicah prisotni med 10^5 ter 10^6 kopij na celico, medtem ko so proteini kot so receptorske molekule prisotni v mnogo manjšem številu kopij (ponavadi v manj kot 100 molekul na celico) in jih navadno sploh ne detektiramo (Görg in sod., 2004).

2.9 RAČUNALNIŠKA ANALIZA GELOV 2-D ELEKTROFOREZE

Eden izmed ciljev proteomike je identifikacija različnega izražanja med kontrolnimi ter eksperimentalnimi vzorci. Iščemo proteinske 2-D lise, ki so inhibirane (ni jih na gelu), inducirane (novi spoti na gelu) ali pa se je nivo njihovega izražanja spremenil (povečana oz. zmanjšana intenziteta). Po tem ko najdemo takšne proteine sledi njihova identifikacija s pomočjo masne spektrometrije (MS). Ta cilj dosežemo z računalniškimi sistemi za analizo slike, še pred tem pa je potrebno sliko aplicirati v digitalnem formatu (Dowsey in sod., 2003).

Ustaljen potek dela pri računalniški obdelavi gelov 2-D elektroforeze:

- ❖ Obdelava slike gela (normalizacija slike, rezanje, odbitje ozadja).
- ❖ Razčlenitev spotov, detekcija, kvantifikacija izražanja.
- ❖ Označevanje spotov ter prekrivanje gelov kontrole z vzorcem.
- ❖ Izračun ujemanja spotov med geloma.
- ❖ Identifikacija različno močno izraženih spotov.

- ❖ Predstavitev rezultatov ter njihova interpretacija.
- ❖ Postavitev 2-D gelske baze (Dowsey in sod., 2003; Garrels 1989).

2.10 *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM ZA PROUČEVANJE MEHANIZMA DELOVANJA ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Saccharomyces cerevisiae sodi med brsteče kvasovke in je objekt številnih raziskav na področju življenjsko pomembnih procesov za obstoj posameznega organizma v zadnjih 100 letih (Hughes, 2002).

Na prvi pogled se mogoče *Saccharomyces cerevisiae* ne zdi primeren modelni organizem za preverjanje učinkov zdravil za humane potrebe, saj gre za enoceličen organizem za katerega bi na prvi pogled težko rekli, da je reprezentativen za kompleksno grajenega človeka, ki ga sestavlja več kot 100 različnih tipov celic organiziranih v številna tkiva ter organe (Sturgeon in sod., 2006).

Kvasni genom sestavlja 6000 genov (Goffeau, 2000) kar je malo v primerjavi s 25000 kodirajočimi regijami človeškega genoma (Pennisi, 2003), kljub vsemu pa so bile študije kvasovk bistvene za razumevanje osnovnih celičnih procesov pri človeku, kot so metabolizem (Hilt, 2004; Wolf, 2004), DNA popravljalni mehanizmi, celični cikel (Hartwell, 1994) in pojasnitev vpletenosti celičnega cikla pri razvoju raka (Hartwell in Kastan, 2004). Za organizem *Saccharomyces cerevisiae* je značilna visoka stopnja ohranjenosti celičnih procesov med kvasovkami ter višje razvitimi organizmi in ravno to je tisto zaradi česar so kvasovke odlično orodje pri študiji vpliva zdravilnih učinkovin (Menacho in Murguía, 2007).

Seveda obstajajo očitne omejitve pri uporabi mikroorganizmov za identifikacijo potencialnih tarč zdravil, vendar pa so primerjalne genomske raziskave pokazale, da 40% aminokislinskega zaporedja kvasnih proteinov deli podobnost z vsaj enim humanim proteinom (Parsons, 2003) ter, da ima 30% genov za katere se ve, da so vpleteni pri razvoju humanih bolezni svoje ortologe med kvasovkami (Foury 1997; Bassett in sod., 1997; Reiter 2001). Humane proteine lahko izrazimo tudi v kvasovki in na ta način s pomočjo fenotipskih mutant pridobimo podatke o strukturnih lastnosti proteina. Glede na strukturo proteina lahko postavimo lestvico strukturno funkcijskih sorodnosti med kvasnimi ter sesalčimi proteini. Dva proteina, ki sta si sorodna v aminokislinskem zaporedju namreč lahko:

- ❖ Izvajata identične funkcije tako v kvasovki kot pri sesalcih (»funkcijska homologa« oz. ortologa).
- ❖ Izvajata podobne, vendar ne identične funkcije.
- ❖ Delita si funkcionalno domeno, se pa popolnoma razlikujeta v drugi domeni, kar je tipična značilnost bifunkcionalnih encimov.
- ❖ Skupen jima je motiv, ki pa ga delita še s številnimi drugimi proteini (npr. nukleotidno vezavno mesto) (Goffeau, 2000).

Med številne pozitivne lastnosti kvasovke *S. cerevisiae*, zaradi katerih se je uveljavila kot modelni organizem, prištevamo robustnost celic kvasovke, kratek podvojevalni cikel ter enostavno vzdrževanje. Kvasovke za razliko od nekaterih drugih modelnih organizmov ne zahtevajo dovršenih sterilnih tehnik ali kompleksnih medijev, so ekonomsko ugodne, njihove potrebe po hranilih pa nezahtevne. Rastejo lahko v obliki dispergiranih celic v tekočem gojišču ali pa tvorijo kolonije na trdih gojiščih. Prištevamo jih v skupino GRAS organizmov (Generally Recognize As Safe), njihova velika prednost pa je tudi v tem da jih z lahkoto apliciramo v postopke visoko zmogljivostnih avtomatskih metod (Parsons in sod. 2003).

Zaradi številnih dostopnih sevov, vektorjev ter genetskega orodja je raziskovalcem omogočen hiter razvoj bioloških testov s kvasovkami (Kroll in sod., 1996), prav tako pa predstavlja kvasovka primeren model za izražanje heterolognih proteinov s številnimi selektivnim označevalci na osnovi prehranskih zahtev ter označevalci za odpornost/občutljivost za antibiotike (Auerbach in sod., 2005). Takšen razpon tehnik olajša študije tujih proteinov/poti, ki jih je v kompleksnejših organizmih težko raziskovati. Dejstvo, da so vse kodirane regije kvasovke danes identificirane, daje možnost primerjave vzdolž celotnega genoma z zbirko mutiranih sevov. Te zbirke omogočajo obširne raziskave delovanje zdravil z genomskega vidika, širok nabor bioinformatičnih virov pa olajša analizo podatkov pridobljenih tekom raziskave (Winzlar in sod. 1999).

Kljub temu, da gre za enocelični organizem, lahko pri kvasovki induciramo izražanje lastnosti, ki so sicer značilne za večje skupine organizmov ter lastnosti pa so pseudohife, itracelularno signaliziranje ter programirana celična smrt (Carroll in sod., 2003).

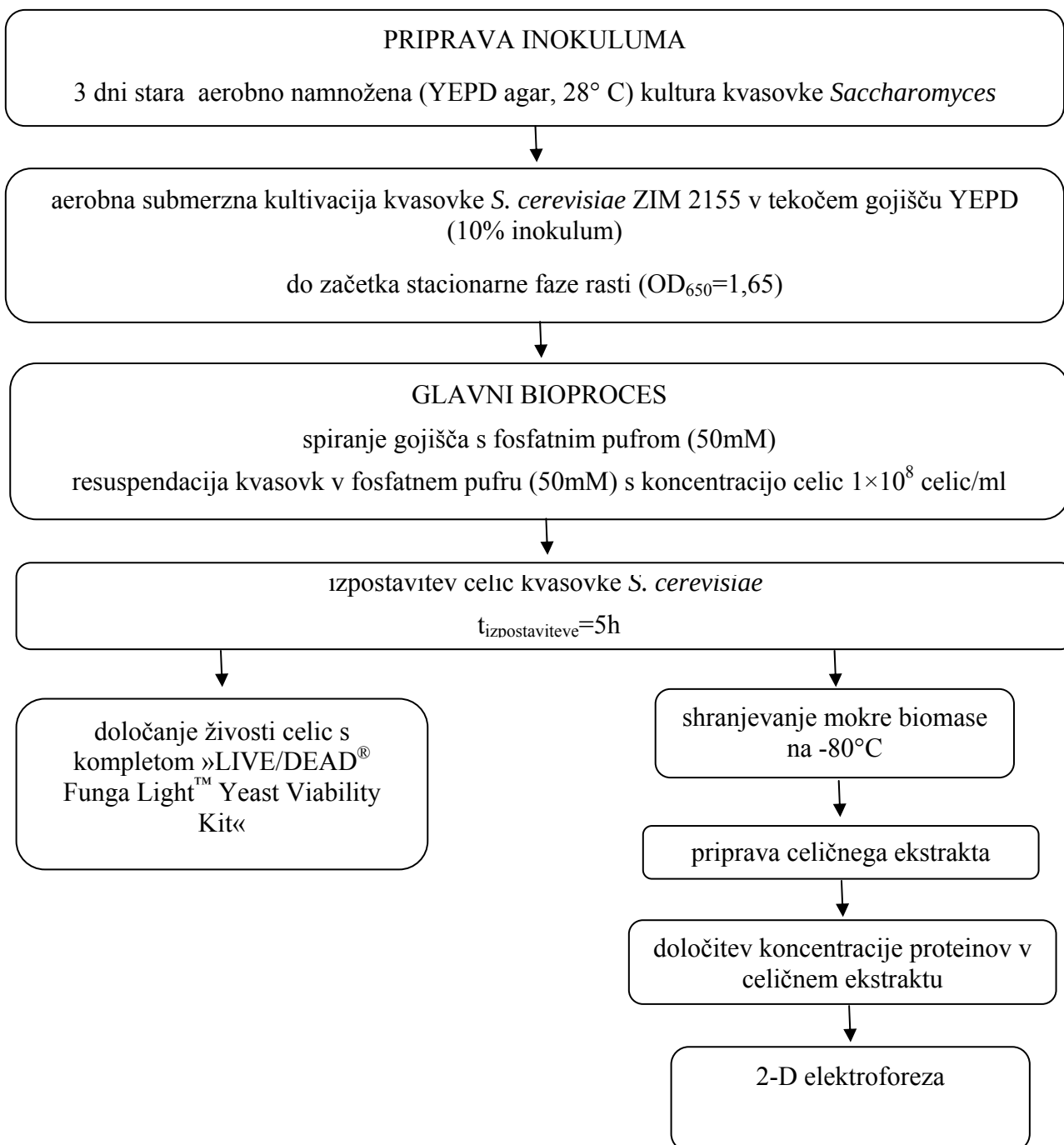
Največji izziv pri razvoju novih zdravil je identifikacija proteinov in celičnih poti na katere zdravilne učinkovine vplivajo. Nepričakovani stranski učinki zdravilnih učinkovin se pogosto odkrijejo šele pozno v razvoju. Nadvse priročno bi bilo imeti pri načrtovanju razvoja novih zdravilnih učinkovin katalog s popisom vseh proteinov, na katere raziskovana zdravilna učinkovina vpliva, da bi lahko razvoj tekel v smeri povečevanja željenih farmakoloških učinkov ter zmanjševanja tistih neželenih, pravtako pa bi bistveno prispeval k izbiri živalskega modela in načrtovanju kliničnih raziskav (Huges, 2002).

V mnogih primerih se zgodi, da humani genom ni zamenljiv s sorodnim kvasnim genomom. Nezmožnost zamenljivosti proteinov v takih primerih ni nujno posledica razlik v bistveni funkciji proteinov temveč v tem, da igra določeno vlogo v poti ali multimernem kompleksu, kjer so se specifične interakcije med proteini v različnih organizmih tudi različno razvile (Tugendreich in sod., 1995). Pogosto se zgodi, da humani protein nima svojega ortologa med kvasovkami. Kljub temu humani in kvasni proteini sodijo v isti set genskih družin, posledica povečanega humanega repertoarja pa gre na račun podvojitev in funkcijske raznolikosti med geni tekom evolucije. Na osnovi zgornje trditve je včasih mogoče preračunati humano pot pri kvasovkah s humanizacijo fizioloških procesov. (Rubin in Lewis 2000; Venter in sod., 2001; Lander in sod., 2001).

Najzgodnejša točka v kateri lahko kvasovke vključimo v potek raziskav pri odkrivanju novih zdravilnih substanc je pri identifikaciji potencialnih tarč delovanja zdravilnih substanc, ter ilustrativen prikaz kako prilagajanje aktivnosti teh specifičnih tarč prispeva k željenemu fiziološkemu rezultatu delovanja zdravilne substance. Kljub temu, da obstajajo očitne oviri pri uporabi mikroorganizmov za identifikacijo potencialnih tarč delovanja zdravilnih substanc na človeške proteine, pa je na tisočim proteinom kvasovke skupno s proteini pri človeku vsaj primarno aminokislinsko zaporedje. Med temi aminokislinskimi zaporednji je več 100 takšnih, katerih zaporedje je podobno zaporedju človeških proteinov, ki so vpleteni pri razvoju bolezni (Bassett in sod. 1997; Reiter, 2001). Znano je tudi, da številne, vsakodnevno uporabljene zdravilne učinkovine, ki imajo za svoje tarče proteine pri človeku, specifično inhibirajo ortologne proteine pri kvasovki npr. lovastatin (Bach in Lichtenhalter, 1983), dejstvo, ki zakonsko upravičuje uborabo kvasne biologije za identifikacijo in raziskovanje potencialnih človeških tarč zdravilnih učinkovin.

3 METODE DELA

Da bi pridobili boljši vpogled v razumevanje mehanizmom delovanja do sedaj še nepojasnjenih zdravilnih učinkov rastline *Mandragora officinarum* smo zastavili eksperiment na sledeč način (slika 5).



Slika 5: Hodogram poteka poskusa

3.1 PRIPRAVA INOKULUMA

Kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo vzdrževali na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem, pri temperaturi 28 °C. Tri dni staro kulturo kvasovke smo s cepilno zanko s petrijeve plošče prenesli v 100 ml tekočega YEPD gojišča v erlenmajerici s stransko roko. Po umerjanju spektrofotometra z gojiščem s kvasovko je znašala optična gostota, izmerjena pri valovni dolžini 650 nm, 0,87. Sledila je dvanajst urna, prekonočna aerobna submerzna kultivacija kvasne biomase na stresalniku pri temperaturi 28° C in hitrosti stresanja 200 obr./min.

Preglednica 1: Priprava trdnega YEPD gojišča

sestavina	količina
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g
pepton (Oxoid)	20 g
brezvodno glukoza	20 g
agar (Biolife)	20 g
dH ₂ O	do 1000 ml

Preglednica 2: Priprava tekočega YEPD gojišča

sestavina	količina
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g
pepton (Oxoid)	20 g
brezvodna glukoza	20 g
dH ₂ O	do 1000 ml

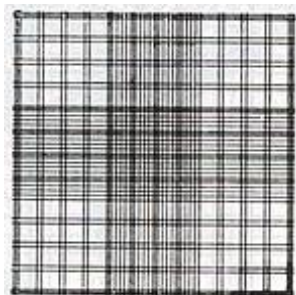
3.1.1 Aerobna submerzna kultivacija kvasovke na stresalniku

Po 12 urni inkubaciji kvasovke v tekočem YEPD gojišču so kvasovke dosegle stacionarno fazo, $OD_{650} = 1,65$ (Habot, 2007), rast kvasovke smo spremljali z merjenjem optične gostote pri 650nm. Pripravili smo 10 % (v/v) inokulum kvasovke *S. cerevisiae* v tekočem YEPD gojišču. Sledila je aerobna submerzna kultivacija kvasne biomase, pri temperaturi 28 °C ter hitrosti stresanja 200 obr./min, na stresalniku. Po šest urni aerobni submerzni kultivaciji je kvasna biomasa dosegla stacionarno fazo $OD_{650} = 1,65$ (Habot, 2007).

3.2 ŠTETJE CELIC

Iz bioprocenke brozge smo odvzeli 1 ml suspenzije celic ter pripravili ustrezne redčitve celic po Kochu (10^{-1}), s pomočjo Bürker-Türkove števne ploščice, ki ima vgravirano mrežo kvadratkov, pa smo določili število celic/ml bioprocenke brozge.

$$\text{Število celic/ml} = N \cdot 2,5 \cdot 10^5 \cdot 10^2 \quad \dots(1)$$



Slika 6: Dvojna mreža na Bürker-Türkovi števni komori

3.3 TRETIRANJE CELIC KVASOVKE Z VZORCI

Pripravili smo suspenzijo celic kvasovke v fosfatnem (50 mM, pH 7) pufru s koncentracijo $1 \cdot 10^8$ celic/ml. Celicam smo dodali ekstrakte korena rastline *Mandragora officinarum*. Sledila je 5 urna izpostavitve celic kvasovk pripravljenim ekstraktom, na stresalniku, pri temperaturi 28 °C ter hitrosti stresanja 200 obr./min.

Preglednica 3: Priprava 50 mM, pH 7 fosfatnega pufru

sestavina	količina pripravljenega pufra	količina	končna koncentracija
K ₂ HPO ₄	1 l	8,71 g	50 Mm
KH ₂ PO ₄	1 l	6,80 g	50 Mm

Ločeno pripravimo po 1 l vsake raztopine, nato pa ju zmešamo med sabo v takem razmerju, da je končni pH 7.

3.4 PRIPRAVA VZORCEV

Koren nadliščka, star 1 leto, katerega masa je znašala 2,49 g smo namočili v 50 ml vrhunskega vina Zlatan Plavec (s 4,00 g sladkorja in 15 % vsebnostjo alkohola, ekološko čistim, ročno obdelanim trsjem, brez uporabe umetnih gnojil ter sintetičnih zaščitnih sredstev), poreklo Hvar, Hrvaška. Namochen koren nadliščka smo inkubirali v temi, pri 4 °C, 28 dni; v tem času je potekala ekstrakcija substanc iz korena v vino. Koren smo nato vzeli iz vina, posamezne vzorčke pa smo pred dodatkom suspenziji celic kvasovk v fosfatnem 50 mM (pH 7) pufru, prefiltrirali preko filtra s 0,25 µm porami, s čimer smo zagotovili mikrobiološko sterilnost vzorca, obenem pa smo iz vina odstranili tudi večje oborjene delce.

Pripravili smo različne koncentracije ekstrakta korena nadliščka v vinu in sicer tako, da smo ekstrakt nadliščka v vinu razredčili s čistim vinom, prav tako pa smo pripravili tudi različne koncentracije vina, ki smo ga razredčili z destilirano vodo, in sicer v sledečih koncentracijah:

- ❖ vzorec 05V: 0,5 mL vina + 4,5 mL ddH₂O
- ❖ vzorev 05VM: 0,5 mL ekstrakta nadliščka v vinu + 4,5 mL ddH₂O,
- ❖ vzorec H₂O: 5 mL ddH₂O,
- ❖ vzorec 5V: 5 mL vina,
- ❖ vzorec 5VM: 5 mL ekstrakta nadliščka v vinu.

Standardni raztopini skopolamina in atropina (0,4 % (w/v) smo pripravili iz:

- ❖ -atropin (p.a. < 97.0, Sigma),
- ❖ -skopolamin (p.a. < 99.0, Sigma),

in sicer tako da smo zatehtali 0,2 mg na 50 mL vina posameznega standarda.

Vse vzorčke smo pred dodatkom suspenziji celic kvasovke v fosfatnem 50 mM pufru (pH 7), sterilno, v laminariju, prefiltrirali preko filtra s 0,25 µm porami.

Pripravili smo tudi kontrolno raztopino, kar pomeni, da smo destilirani vodi dodali tolikšno količino 96 % etanola, da je znašala končna vsebnost etanola v vodi 15 %, pH tako pripravljene kontrolne raztopine pa smo uravnali s koncentrirano citronsko kislino na pH 3,39. Tudi v kontrolni raztopini smo inkubirali koren nadliščka, star eno leto, katerega masa je znašala 2,49 g ter inkubirali 28 dni, v hladilniku, pri 4 °C, v temi. Pripravili smo tudi negativno kontrola tega vzorčka, ki ni vsebovala korena nadliščka.

Našo negativno kontrolo je predstavljala destilirana voda. Suspenziji kvasovk v fosfatnem 50 mM (pH 7) pufru smo dodali enako količino destilirane vode, kot smo preostalim vzorčkom dodali ekstrakta nadliščka v kontrolni raztopini oz. same kontrolne raztopine, in sicer sledeče vzorce:

- ❖ vzorec E: 0,5 mL kontrolne raztopine + 4,5 mL ddH₂O,
- ❖ vzorec EM: 0,5 mL ekstrakta nadliščka v kontrolni raztopini + 4,5 mL ddH₂O.

3.5 DOLOČANJE ŽIVOSTI CELIC

Po 5-urni inkubaciji kvasnih celic tretiranih z ekstrakti korena *Mandragora officinarum* smo odvzeli iz vsakega vzorca 1 ml suspenzije celic v pufru in s pomočjo kompleta »LIVE/DEAD® Funga Light™ Yeast Viability Kit« določili živost kvasovk. Preostalo suspenzijo celic v pufru smo centrifugirali pri 4000 obr./min, t = 5 min, odlili supernatant ter ponovno resuspendirali v svežih 50 ml fosfatnega 50 mM pufra (pH 7). Sledila je ponovna centrifugacija suspenzije celic v fosfatnem pufru pri 4000 obr./min, t = 5min.

»LIVE/DEAD[®] Funga Light[™] Yeast Viability Kit« omogoča enostavno, zanesljivo in kvantitativno ovrednotenje živosti kvasovk v zgolj nekaj minutah. Kit vsebuje dve fluorescentni barvili SYTO[®] 9, zeleno fluorescentno barvilo, ki se veže na nukleinske kisline ter rdeče fluorescentno barvilo propidijev jodid, ki se prav tako veže na nukleinske kisline (Haugland, 2002). Barvili se med seboj razlikujeta po spektru svojega delovanja in po sposobnosti penetracije skozi celično membrano živih celic. Barvilo SYTO[®] 9 obarva vse kvasne celice v populaciji, tako tiste s poškodovano membrano kot tiste z intaktno membrano, medtem ko se s propidijevim jodidom obarvajo samo celice s poškodovano membrano, zaradi česar pride do redukcije fluorescenčnega prenosa resonančne energije. Pri pripravi mešanice obeh barvil se kvasovke z nepoškodovano membrano obarvajo zeleno, tiste s poškodovano membrano pa rdeče. Vzbujevalna/emisijska vrhova za barvili znašata 480/500 nm za SYTO[®] 9 in 490/635 nm za propidijev jodid.

3.6 ANALIZA PROTEINOV CELIČNEGA EKSTRAKTA

Pred nadaljno analizo celične suspenzije kvasovk smo vzorce počasi, na ledu, odtajali. Uporabili smo metodo razbijanja s cirkonij/kremenčevimi kroglicami (Scopes, 1987). K biomasi v mikrocentrifugirkah smo dodali ohlajen ekstrakcijski pufer in cirkonij/kremenčeve kroglice v razmerju 1:5:5. Tako pripravljeno suspenzijo celic, cirkonij/kremenčevih kroglic, z dodanimi proteaznimi inhibitorji in ekstrakcijskega pufra smo vrtinčili na vrtičniku 1 minuto, temu pa je sledila 1 minutna inkubacija suspenzije na ledu. Postopek razbijanja smo ponovili 5-krat. Po končanem razbijanju smo mikrocentrifugirke z vsebino izpostavili še 20-minutni sonifikaciji. Pridobljen homogenat smo centrifugirali 20 minut pri 20000 g in $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V supernatantih smo določili koncentracijo proteinov in jih do nadaljne obdelave vzorcev hranili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica 4: Priprava ekstrakcijskega pufra

sestavina	količina
1M Tris-HCl, pH 8,0	4 ml
CHAPS	2 g
DTT	1 g
ddH ₂ O	do 200 ml

Preglednica 5: Priprava 1M Tris-HCl pufru, pH 8,0

sestavina	količina
tris baza	24,2 g
ddH ₂ O	150 ml
uravnamo pH na 8,0 s koncentrirano HCl	
ddH ₂ O	do 200 ml

3.7 DOLOČANJE KONCENTRACIJ PROTEINOV V CELIČNEM EKSTRAKTU

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

Metoda temelji na dejstvu, da se barvilo Coomassie brilliant modro G-250 veže na proteine. Ob vezavi barvila na proteine se rdeča barva barvila spremeni v modro, s tem pa se spremeni tudi absorpcijski maksimum barvila iz 465 nm na 595 nm. Postopek vezave barvila na proteine je hiter (2min), kompleks protein-barvilo, ki se ob tem tvori, pa ostane stabilen približno eno uro.

50 µl raztopine celičnega ekstrakta v ekstrakcijskem pufru (celični ekstrakt : ekstrakcijski pufer = 1 : 4) smo odpipetirali v male steklene epruvete in dodali 2,5 ml razredčenega Bradfordovega reagenta (Bradfordov reagent : ddH₂O = 1 : 5). Vzorce smo premešali in po 5 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Slep vzorec, ki smo ga pripravili je vseboval namesto celičnega ekstrakta enako količino ekstrakcijskega pufru.

Iz umeritvene krivulje (priloga B) smo izračunali maso proteinov v pripravljenih 50µl redčenega celičnega ekstrakta na podlagi enačbe:

$$A_{595}=0,516x - 0,02233 \quad \dots (2)$$

Umeritvena krivulja je bila pripravljena z znanimi koncentracijami govejega serumskega albumina (BSA) redčenega v 0,15M ratopini NaCl.

3.8 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA

2-D elektroforeza je močno razširjena metoda za analizo kompleksnih mešanic proteinov ekstrahiranih iz celic, tkiv ter drugih bioloških vzorcev. Ločevanje proteinov z 2-D elektroforezo poteka na osnovi dveh neodvisnih lastnosti proteinov, v dveh dimenzijah. V prvi dimenziji poteka izoelektrično fokusiranje (IEF), kjer se proteini ločujejo na osnovi izoelektrične točke (pI); v drugi dimenziji pa se proteini ločujejo na podlagi njihove molekulske mase (M); drugo dimenzijo poznamo tudi pod imenom SDS-poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE).

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

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

1. dimenzija

1. dimenzija obsega več korakov:

- rehidracija trakov,
- izoelektrično fokusiranje – IEF.

3.8.1 Rehidracija trakov

Uporabili smo 13 cm dolge trakove z imobiliziranim pH gradientom (3 - 10), ki smo jih hranili na – 20 °C. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek smo uravnali v ravnotežno pozicijo, v sredino reže pa odpipetirali 250 µl vzorca v rehidracijskem pufru ($m_{\text{proteinov}} = 150 \mu\text{g}$). S traku smo z anodnega konca (+) odstranili plastično folijo, ki prekriva gel, in ga previdno, brez tvorbe mehurčkov položili v režo, z gelom navzdol (vzorec z rehidracijskim pufrom mora prekriti celotno površino gela, če želimo enakomerno rehidrirati trakove). Režo z rehidracijskih trakov smo prekrili s 3 ml mineralnega

olja, da bi preprečili izhlapevanje vzorca. Podstavek smo prekrili s pokrovom. Rehidracija poteka vsaj 13 ur.

Preglednica 6: Priprava rehidracijskega pufru

sestavina	končna koncentracija	količina
urea	7 M	10,5 g
CHAPS	2 % (w/v)	0,5 g
tiourea	2 M	3,8 g
amfoliti (IPG pufer)		500 µl
bromfenol modro		0,0005 g
ddH ₂ O		do 25 ml

3.8.2 Izoelektrično fokusiranje

Po končani rehidraciji smo trakove narahlo sprali z bidestilirano vodo ter jih osušili na filter papirju, z gelom obrnjenim navzgor. Na ploščo, ki med potekom IEF zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C, smo nanesti 4 ml mineralnega olja, na to pa položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki (anodni priključek je nameščen na vrhu plošče). V podstavek smo položili plastično ploščo z vdolbinami, predhodno pa v steklen podstavek nalili še 10 ml mineralnega olja, ki omogoča enakomerno ohlajanje rehidracijskih trakov tekom IEF. V vdolbine plastične plošče smo položili trakove, z gelom obrnjenim navzgor, s pozitivnim (+) koncem na zgornjem delu plošče. Odrezali smo dva enako dolga elektrodna trakova ter jih omočili z bidestilirano vodo. Pred nanosom elektrodnih trakov smo le-te osušili na filter papirju ter jih položili pravokotno na oba konca trakov. Na elektrodne trakove smo namestili elektrodi, vse skupaj pa nato prelili s približno 170 ml mineralnega olja.

Po končani IEF smo trakove shranili v zavarjenih plastičnih mapah pri – 80 °C do izvedbe 2. dimenzije.

2. dimenzija

2. dimenzija obsega več faz:

- ❖ vlitje gelov,
- ❖ uravnoteženje IPG stripov v SDS pufru,
- ❖ nanos IPG stripov na SDS gel,

❖ SDS-PAGE.

2-D – SDS elektroforeza je metoda za ločevanje polipeptidov glede na njihovo molekulsko maso. Izvaja se v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje SDS. SDS in proteini tvorijo komplekse (1,4 g SDS/g proteina). SDS »zamaskira« naboj proteinov in tvori z njimi anionske komplekse, ki imajo konstantno negativen naboj na enoto mase. Poleg SDSa je gelu dodan še reduktant, ki cepi disulfidne vezi v proteinih. Če proteine tretiramo s SDS in DTT, bo njihovo ločevanje v večji meri odvisno samo od njihove molekulske mase. Dobimo linearno zvezo med logaritmom molekulske mase proteinov in relativno razdaljo migracije kompleksa polipeptid-SDS.

3.8.3 Vlivanje gelov

Med dve stekleni plošči, ki skupaj z ostalimi sestavnimi deli oblikujeta kalup, smo vlili ločilni gel (19ml) z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida. Na zgornjo površino gela smo z mikropipeto nanесли tanko plast bidestilirane vode, ki gelu preprečuje stik s kisikom s čimer je omogočena enakomerna polimerizacija gela. Polimerizacija poteka čez noč. Ko so geli osušeni odlijemo vodo, in osušimo površino nad gelom.

Preglednica 7: Priprava 12 % poliakrilamidnega gela

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

Zmešamo prve štiri sestavine in razplinimo z 10-minutno inkubacijo v ultrazvočni kopeli. Dodamo APS in TEMED ter premešamo s stekleno paličico. Takoj po dodatku APS-a in TEMED-a se prične polimerizacija. Raztopina zadostuje za pripravo dveh gelov.

Preglednica 8: Priprava 10 % (w/v) raztopine SDS

sestavina	količina
SDS	10,0 g
ddH ₂ O	do 1000 ml

Preglednica 9: Priprava 10 % (w/v) raztopine APS

sestavina	količina
APS	0,1 g
ddH ₂ O	do 1 ml

Preglednica 10: Priprava 1,5 M Tris-HCl, pH 8,0

sestavina	količina
tris baza	24,2 g
ddH ₂ O	150 ml
uravnamo pH na 8,0 s koncentrirano HCl	
ddH ₂ O	do 200 ml

3.8.4 Uravnoveženje trakov

Trakove iz zamrzovalnika (- 80 °C) prenesemo v epruvete, ki vsebujejo 10 ml pufru za uravnoveženje I ter inkubiramo na stresalniku, pri sobni temperaturi za 15 min. Trakove nato prenesemo v 10 ml pufru za uravnoveženje II ter ponovno inkubiramo na stresalniku, pri sobni temperaturi za 15 minut. Trakove pred nanosom na gel dobro osušimo na filter papirju.

Preglednica 11: Priprava osnovne raztopine ravnotežnega pufra

sestavina	količina	končna koncentracija
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	75 mM
urea	18 g	6 M
glicerol	15 ml	30 % (v/v)
SDS	1 g	2 % (w/v)
bromfenol modro	kristalček	0,002 % (w/v)
ddH ₂ O	do 50 ml	

Preglednica 12: Priprava pufra za uravnoteženje I

sestavine s količino
zatehtamo 0,2 g DTT v plastično falkonko in jo ovijemo v alu folijo
dodamo 20 ml pufra za uravnoteženje-osnovni
zmešamo da se raztopi in razdelimo v 2 epruveti (po 10 ml)

Preglednica 13: Priprava pufra za uravnoteženje II

sestavine s količino
zatehtamo 0,96 g jodacetamida (JAA) v plastično falkonko in jo ovijemo v alu folijo
dodamo 20 ml pufra za uravnoteženje-osnovni
zmešamo, da se raztopi in razdelimo v 2 epruveti po 10 ml

3.8.5 Prenos trakov na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo do vrha nalili 1 % agarozno raztopino, z dodanim indikatorjem bromfenol modrim, in skozi jo spustili trak, tako da se je v celoti usedel na površino ločilnega gela.

Preglednica 14: Priprava 1 % agarozne raztopine

sestavine s količino
v 250 ml infuzijsko stekleničko zatehtamo 0,5 g agaroze
dodamo 100 ml 1× SDS elektroforeznega pufra
raztopino segrejemo v mikrovalovni pečici, da se agarozla lažje raztopi
dodamo en kristalček barvila bromfenol modro

Raztopino razdelimo v plastične centrifugirke (po 11 ml) in hranimo pri sobni temperaturi 1 mesec.

3.8.6 SDS-PAGE

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup prenesli v posodo z elektrodami, katero smo predhodno napolnili z 1×SDS pufrom. 1×SDS pufer nalijemo tudi v manjšo banjico, ki je nameščena na zgornjem delu kalupa gelov. Potovanje vzorcev je potekalo s sprotnim hlajenjem v smeri elektrode najprej 40 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel nato pa pri konstantnem toku 50mA/gel, dokler barvilo bromfenol modro, ni doseglo spodnjega roba gela.

Preglednica 15: Priprava 5×SDS elektroforetskega pufra

sestavina	količina	končna koncentracija
tris baza	15 g	260 mM
glicin	72 g	960 mM
SDS	5 g	0,5 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O	do 1000 ml	

Preglednica 16: Priprava 1×SDS elektroforetskega pufra

sestavina s količino
400 ml 5× SDS elektroforeznega pufra
1600 ml ddH ₂ O

3.8.7 Barvanje gelov

Po končani SDS-PAGE smo gele obarvali s fluorescentnim barvilom SYPRO Ruby. Sypro Ruby je visoko občutljivo barvilo za kvantifikacijo proteinov.

Preglednica 17: Postopek barvanja gelov s fluorescentnim barvilom Sypro ruby

korak		raztopina	čas
1	fiksacija	50% metanol + 7% ocetna kislina	30 min
		50% metanol + 7% ocetna kislina	30 min
2	barvanje	SYPRO Ruby	prekonočna inkubacija
3	spiranje	10 % metanol + 7 % ocetna kislina	30 min
		10 % metanol + 7 % ocetna kislina	30 min
		ddH ₂ O	5 min
		ddH ₂ O	5 min

3.8.8 Dokumentacija gelov in obdelava slik

Gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov G-BOX:HR (Syngene). Fluorescentno barvilo SYPRO Ruby, ki smo ga uporabili za vizualizacijo z 2D-elektroforeznim postopkom ločenih proteinov, ima 2 ekscitacijska vrha, enega pri ~ 280 nm in drugega pri ~ 450 nm, emisijski maksimum pa pri 210 nm. Za slikanje proteinov obarvanih z barvilom SYPRO Ruby smo kot izvor ekscitacijske svetlobe uporabili UV svetlobo (300 nm).

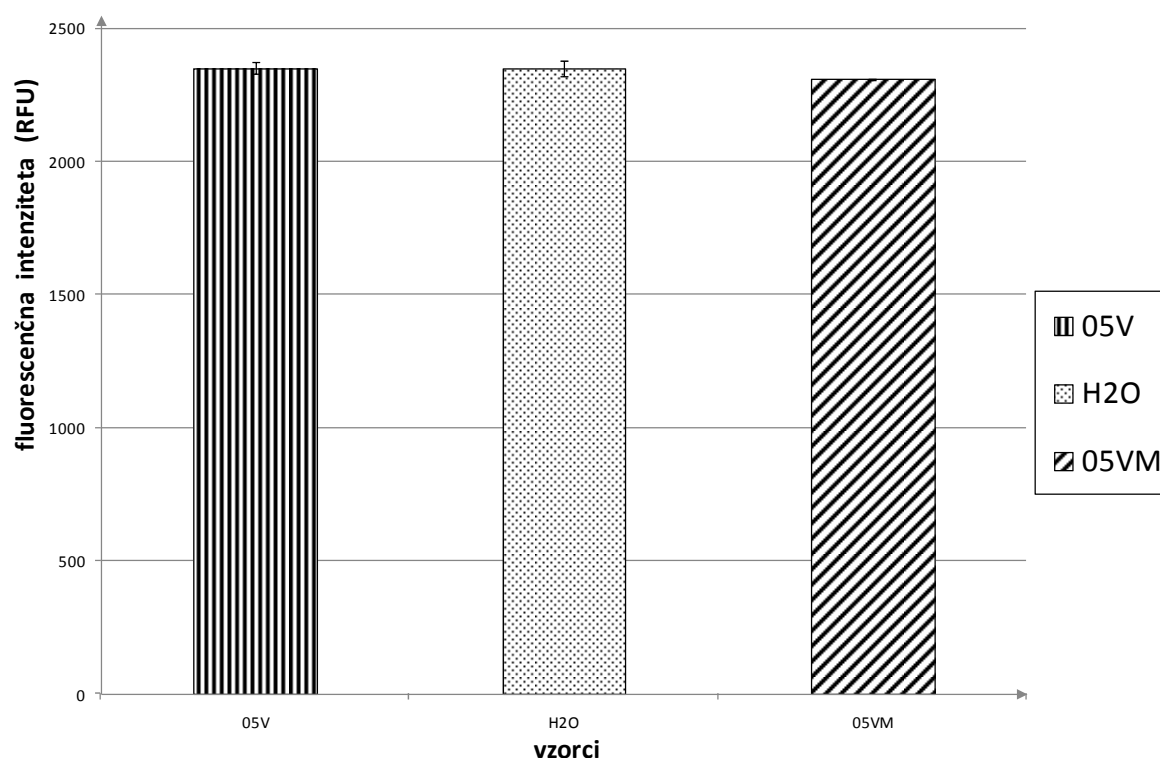
Slike gelov smo analizirali z računalniškim programom Dymension 2-D analysis software (verzija 2,02) (Syngene). Program nam omogoča primerjavo večih gelov med sabo. Pri primerjavi gelov vedno enega izmed njih določimo kot kontrolo na katerega nato program primerja preostale gele. Program določi točno pozicijo individualnih 2-D lis (jih obkroži) in kvantitativno ovrednoti vsako 2-D liso iz njene oblike in intenzitete. Sledi izračun ujemanj in primerjava identičnih 2-D lis med geli (Cellini in sod., 2004). Po izračunu ujemanj posameznih 2-D lis med geli se v tabeli izpišejo vse ujemajoče 2-D lise, kar pomeni, da program izbere in izračuna razmerje normaliziranih volumnov za vse 2-D lise, ki se ponovijo

na vseh primerjanih gelih. Normaliziran volumen je razmerje med volumnom ene 2-D lise napram celokupnemu volumnu vseh 2-D lis na gelu. Upoštevali smo privzete nastavitve merjenja ozadja in identifikacije lis glede na razmerje intenzitete in šuma. Vse poravnave proteinov smo preverili z ročnim pregledovanjem slike.

4 REZULTATI

4.1 TRETIRANJE KVASOVK Z VZORCI

Suspenzijo kvasovke, s koncentracijo 1×10^8 celic/mL v fosfatnem pufru, smo tretirali z vinom (05V), ekstraktom nadliščka v vinu (05VM) in ddH₂O (H₂O) - dodatek 0,5 mL na 50 mL suspenzije celic. Po končanem 5-urnem tretiranju smo določili živost tretiranih celic, ki je prikazana na sliki 7. Izvedli smo 2 tehnični ponovitvi biološkega poskusa. Zaradi omejene količine ekstrakta nadliščka vzporedna biološka ponovitev poskusa ni bila izvedena.

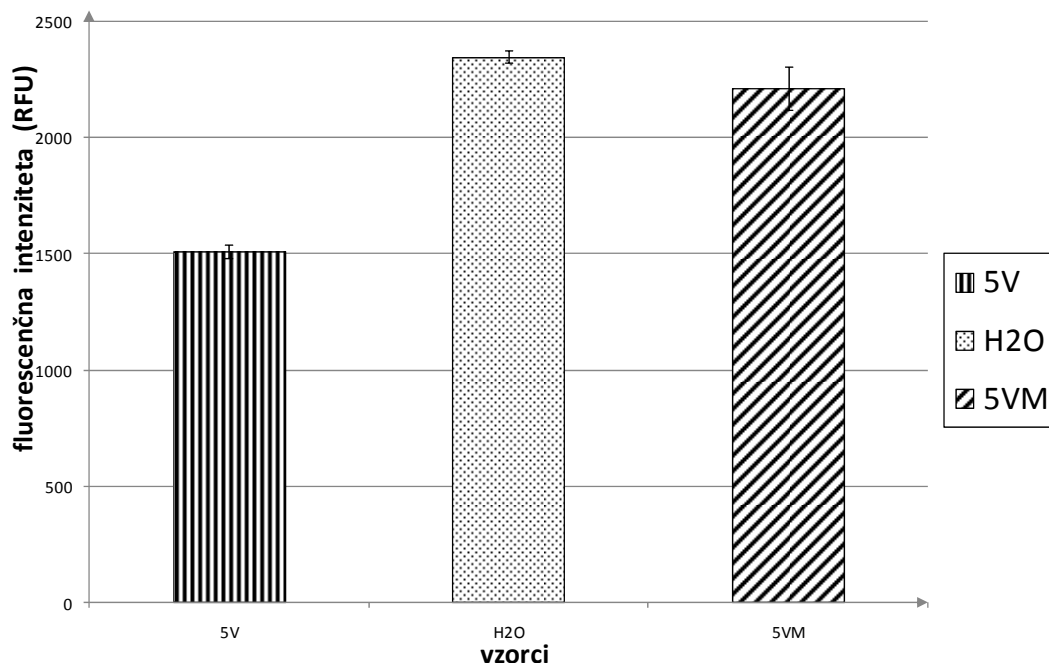


Slika 7: Vpliv vode (H₂O), ekstrakta nadliščka v vinu (05VM) in vina (05V), v dodatku 0,5 mL, na živost kvasovke *S. cerevisiae*

S slike 7 je razvidno, da H₂O, 05VM in 05V, ki smo jih dodali celicam kvasovk, za celice niso bili toksični. Živost je bila v vseh vzorcih primerljiva. Razlike v živosti med vzorcema H₂O in 05V in H₂O in 05VM sta <1%, razlika v živosti med vzorcema 05V in 05VM je 2%.

Ponovili smo biološki poskus, v katerem smo celice kvasovk tretirali z vzorci vina (5V), ekstrakta nadliščka v vinu (5VM) in ddH₂O (H₂O), tokrat v dodatku 5 mL k 45 mL suspenzije

celic kvasovk v fosfatnem pufru (s koncentracijo 1×10^8 celic/mL). Po končanem tretiranju smo naredili test živosti, rezultati testa pa so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Vpliv vode (H_2O), ekstrakta nadliščka v vinu (5VM) in vina (5V), v dodatku 5 ml, na živost kvasovke *S. cerevisiae*

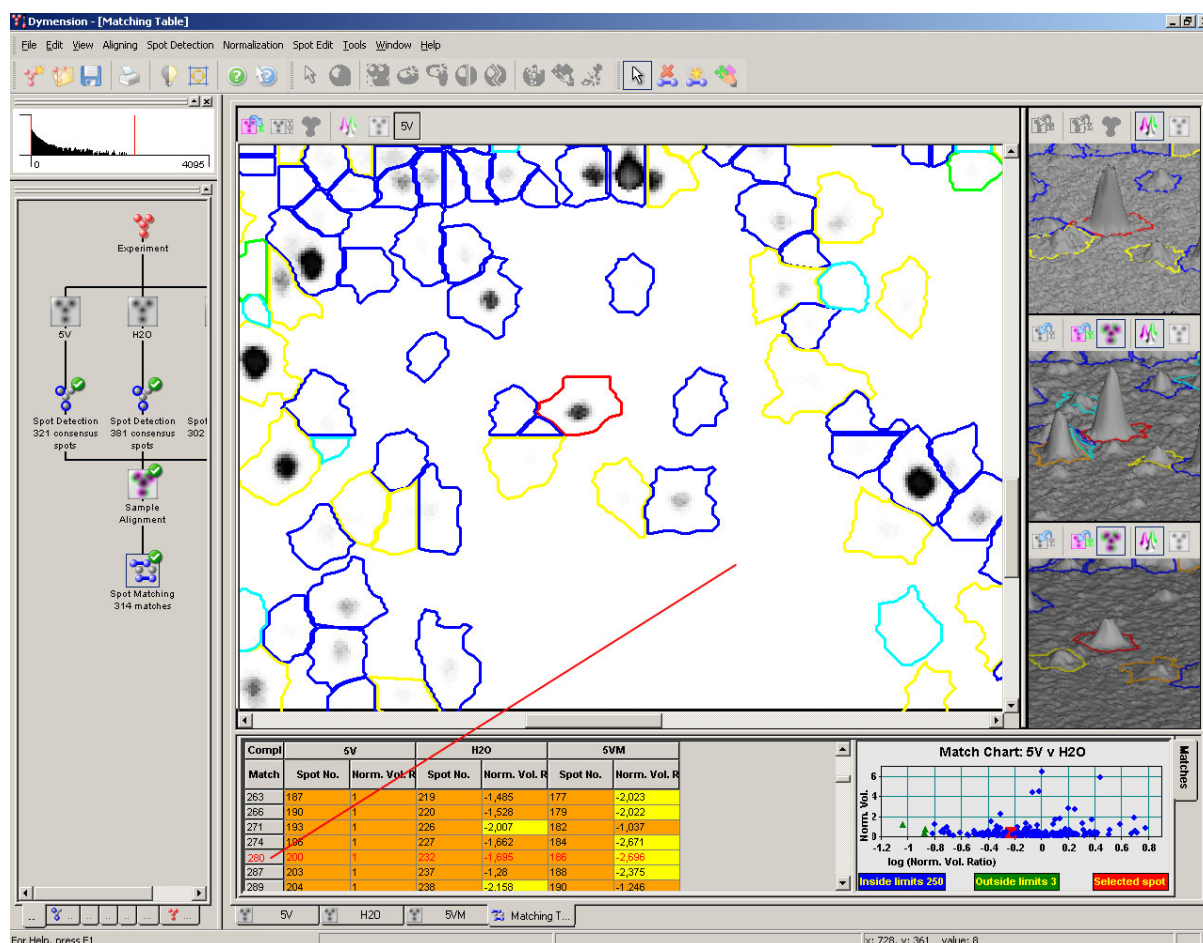
Izkazalo se je, da tudi višje koncentracije dodanih vzorcev 5VM in H_2O niso toksične za celice kvasovk, razen v primeru vzorca 5V, kjer se je živost celic zmanjšala za 36% v primerjavi z vzorcem H_2O in za 32 % v primerjavi z vzorcem 5VM, medtem ko je razlika med vzorcem H_2O in 5VM le 6 %.

4.2 ANALIZA CELIČNIH PROTEINOV Z 2-D ELEKTROFOREZO

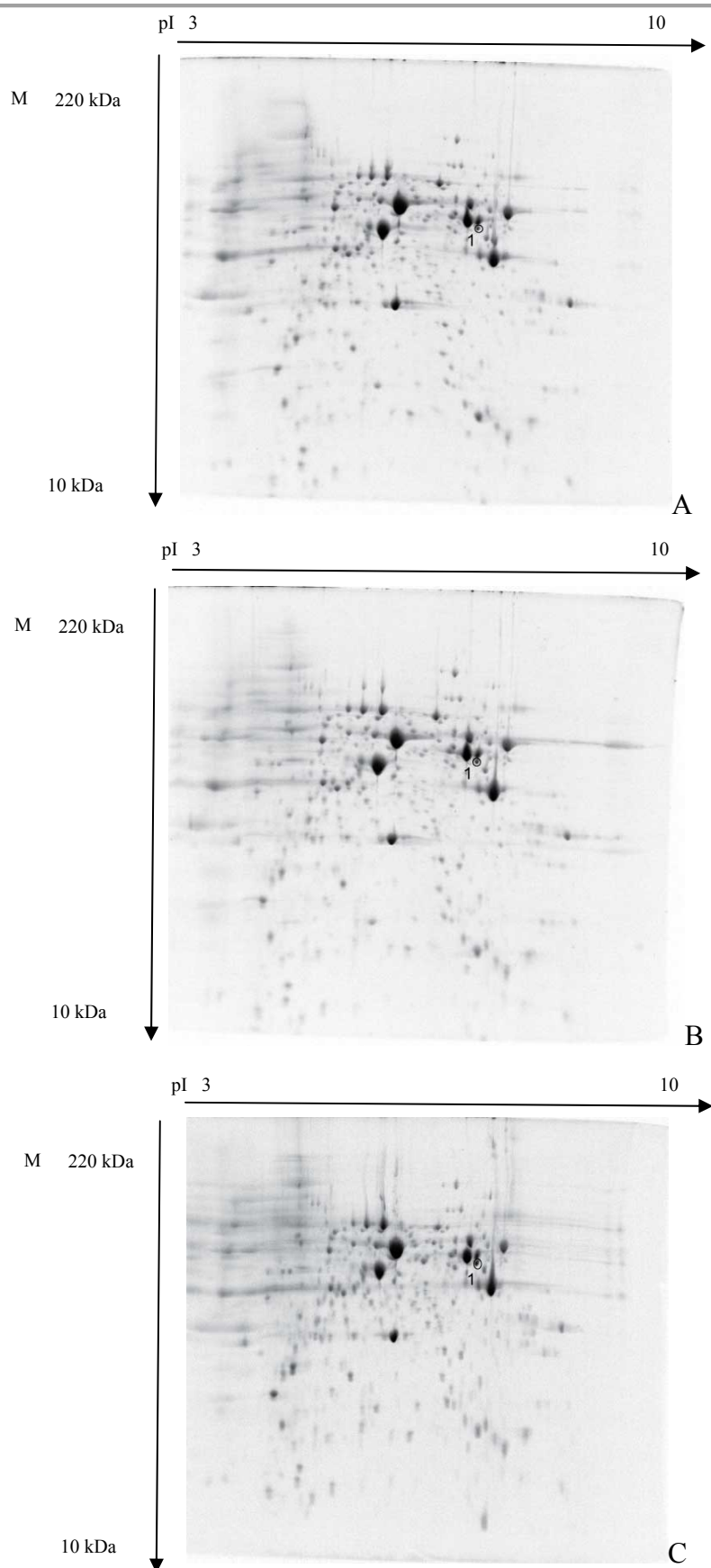
S programom 2-D Dymension smo naredili primerjavo 2-D proteinskih profilov celičnega ekstrakta kvasovke. Naredili smo primerjavo vzorcev vode in ekstrakta nadliščka v vinu glede na vino, torej primerjavo vzorca H_2O in 05VM glede na 05V ter H_2O in 5VM glede na 5V. Primerjali smo intenzitete (vrednosti normaliziranih volumnov) posameznih 2-D elektroforetskih lis in rezultate izrazili kot razmerje (R) normaliziranih volumnov 2-D lis vzorca H_2O ali 05VM glede na vzorec 05V oz. kot razmerje vzorca H_2O ali 5VM glede na vzorec 5V.

Pri primerjavi normaliziranih volumnov posameznih 2-D lis vzorcev vina in ekstrakta nadliščka v vinu, smo izbrali kot značilne tiste 2-D lise pri katerih je bilo razmerje normaliziranih volumnov 1,5-kratno. Izbrane 2-D lise so morale ustrezati tudi dodatnemu kriteriju, po katerem se je morala intenziteta 2-D lise vzorca ekstrakta nadliščka v vinu vsaj za faktor 1,5 razlikovati od intenzitete ustrezne 2-D lise pri kontroli (H₂O).

Na sliki 9 je prikazan primer 2-D lise, ki je prišla v upoštevek pri izboru razlik v izražanju med tretiranimi in netretiranimi vzorci.

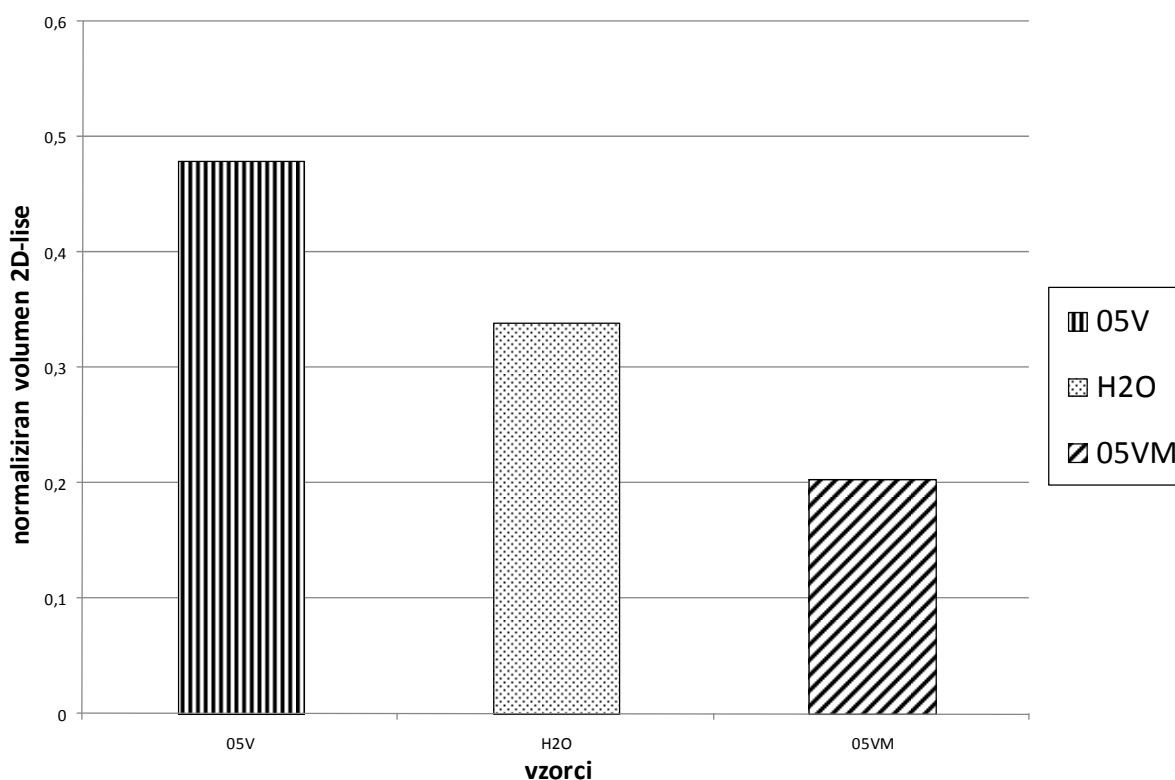


Slika 9: Prikaz računalniške obdelave 2-D lis

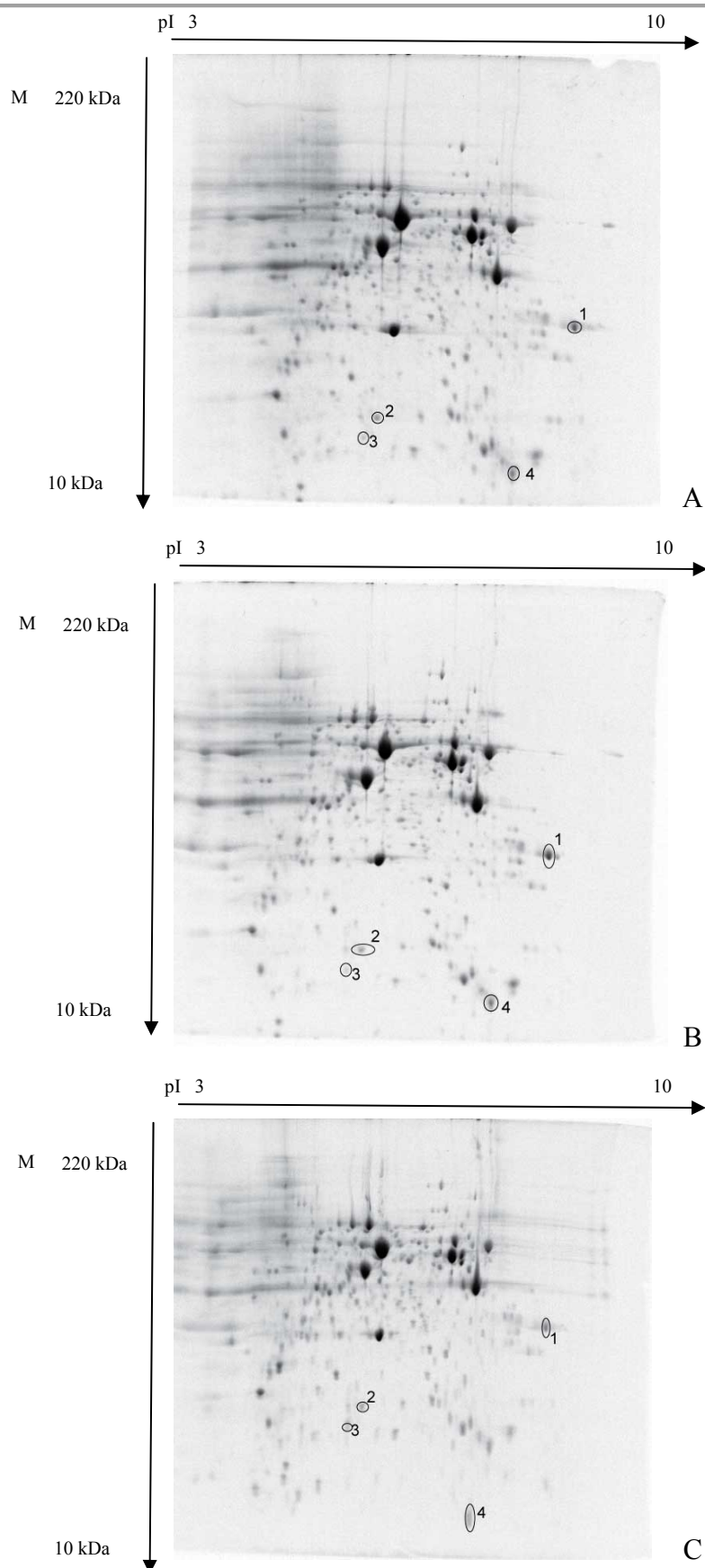


Slika 10: Vpliv vina (A), ekstrakta nadliščka v vinu (B) in vode (C) na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae* (dodatek 0,5 mL)

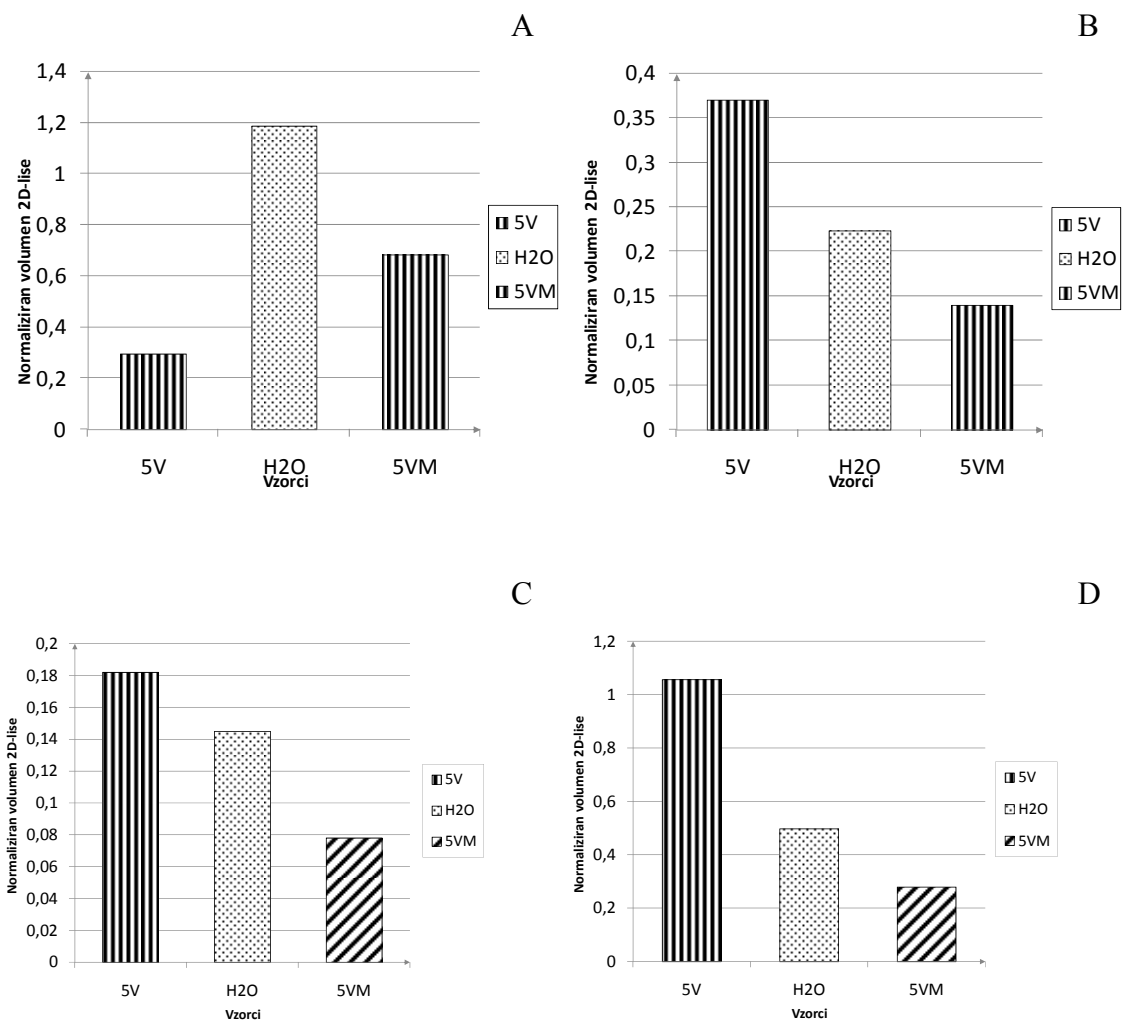
Na podlagi opisanih kriterijev za izbor 2-D lise, smo pri primerjavi proteinskih profilov vzorcev 05V, H₂O in 05VM določili eno 2-D liso (slika 10), pri kateri je iz primerjave normaliziranih volumnov posameznih vzorcev razviden nasproten učinek vzorcev 05V in 05VM glede na H₂O (slika 11). Intenziteta izbrane 2-D lise vzorca 05V je za faktor 2,36 večja od intenzitete 2-D lise vzorca 05VM, prav tako pa se intenziteta ustrezne 2-D lise pri kontroli razlikuje glede na 2-D liso vzorca 05VM za faktor 1,67.



Slika 11: Prikaz normaliziranih volumnov 2D-lise št. 1 kot posledica različnega vpliva vzorcev 05V, H₂O in 05VM na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae*



Slika 12: Vpliv vina (A), ekstrakta nadliščka v vinu (B) in vode (C) na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae* (dodatek 5 ml)

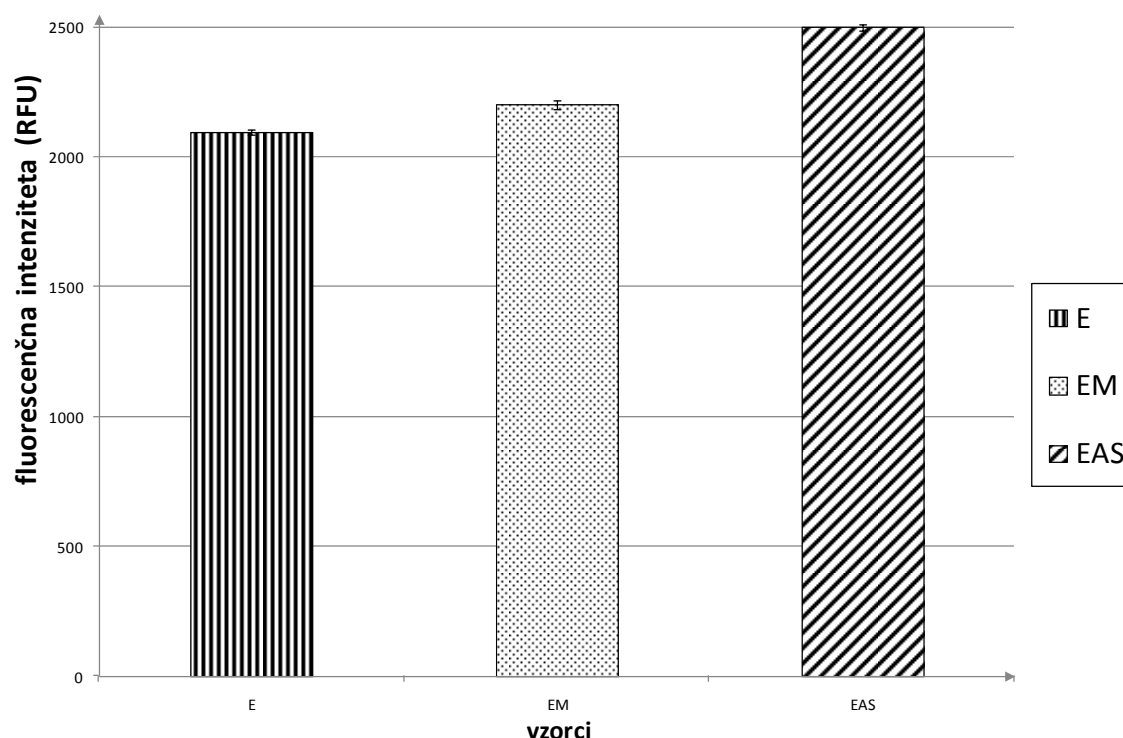


Slika 13: Prika normaliziranih volumnom 2D-lis št. 1(A), 2(B), 3(C) in 4 (D) kot posledica različnega vpliva vzorcev 5V, H₂O in 5VM na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae*

Kriterijem za izbor 2-D lise pri primerjavi proteinskih profilov vzorcev 5V, H₂O in 5VM ustrezajo štiri 2-D lise (slika 12). Primerjava normaliziranih volumnov posameznih vzorcev kaže na nasproten učinek vzorcev 5V in 5VM glede na H₂O (slika 13). Intenziteta posamezne 2-D lise se značilno razlikuje pri primerjavi intenzitete ustrezne 2-D lise med vzorcema 5V in 5VM, in sicer za faktor 2,27 za 2-D liso št. 1, za faktor 2,70 za 2-D liso št. 2, za faktor 2,38 za 2-D liso št. 3 in za faktor 2,10 za 2-D liso št. 4. Prav tako se intenziteta ustrezne 2-D lise pri kontroli razlikuje glede na 2-D liso vzorca 5VM in sicer sledeče za posamezne 2-D lise, za 2-D liso št. 1 za faktor 1,74, za 2-D liso št. 2 za faktor 1,6, za 2-D liso št. 3 za faktor 1,86 in za 2-D liso št. 4 za faktor 2,17.

Vzporedno s poskusom v katerem smo preverjali vpliv dodatka V, VM in H₂O k suspenziji celic kvasovke *S. cerevisiae* v fosfatnem pufru, smo izvedli tudi poskus v katerem smo opazovali spremembe v proteinskem profilu kvasovke tretirane s kontrolno raztopino (ddH₂O s 13% (v/v) etanolom ter pH 3,4 uravnanim s koncentrirano citronsko kislino → vzorec E), ekstraktom nadliščka v vodi (ddH₂O s 13% etanolom, s pH 3,4 uravnanim s koncentrirano citronsko kislino ter namočenim korenem nadliščka, ki smo ga po 28 dneh vzeli iz raztopine → vzorec EM) ter kontrolno raztopino s standardnima raztopinama skopolamina in atropina (ddH₂O s 13% etanolom, s pH 3,4 uravnanim s koncentrirano citronsko kislino ter dodanima standardoma skopolamina in atropina → vzorec EAS).

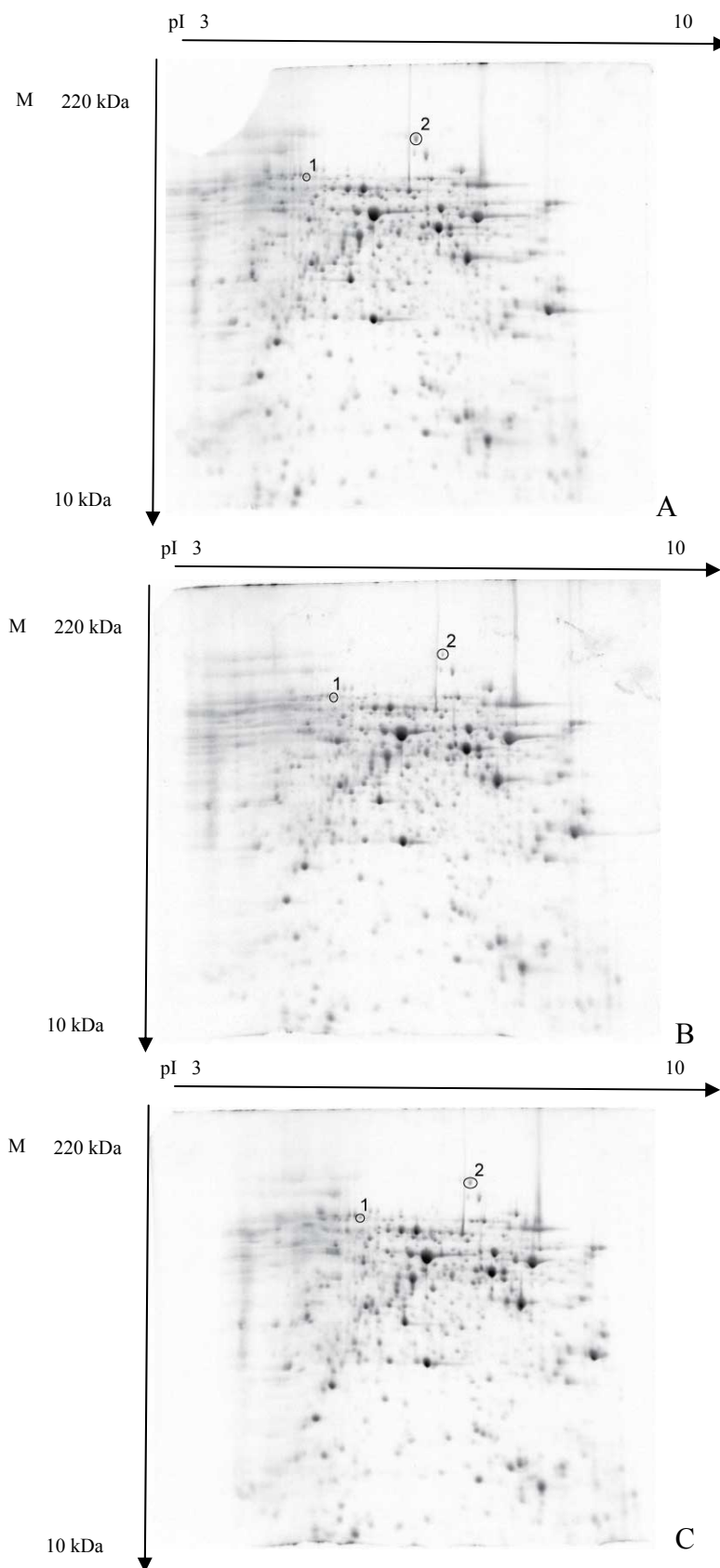
Test živosti je pokazal, da vzorci v dodatku 0,5 ml na 50 ml suspenzije celic kvasovk s koncentracijo 1×10^8 celic/mL v fosfatnem pufru, niso bili toksični za celice kvasovk (slika 14).



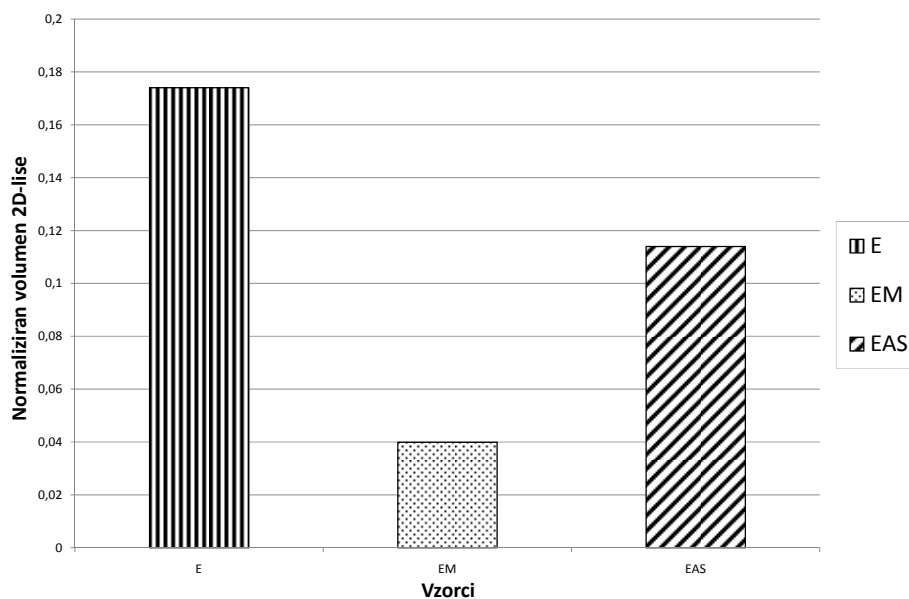
Slika 14: Vpliv vode (E), ekstrakta nadliščka v vodi (EM) in standardoma skopolamina in atropina v vodi (EAS), v dodatku 0,5 ml, na živost kvasovke *S. cerevisiae*

S programom 2-D Dymension smo naredili primerjavo 2-D proteinskih profilov celičnega ekstrakta kvasovke. Naredili smo primerjavo vzorcev ekstrakta nadliščka v kontrolni raztopini (EM) in standardoma skopolamina in atropina v kontrolni raztopini (EAS) glede na vzorec kontrolne raztopine (E). Primerjali smo intenzitete (vrednosti normaliziranih volumnov) posameznih 2-D lis, in med njimi poiskali takšne, pri katerih je bilo to razmerje vsaj 1,5-kratno.

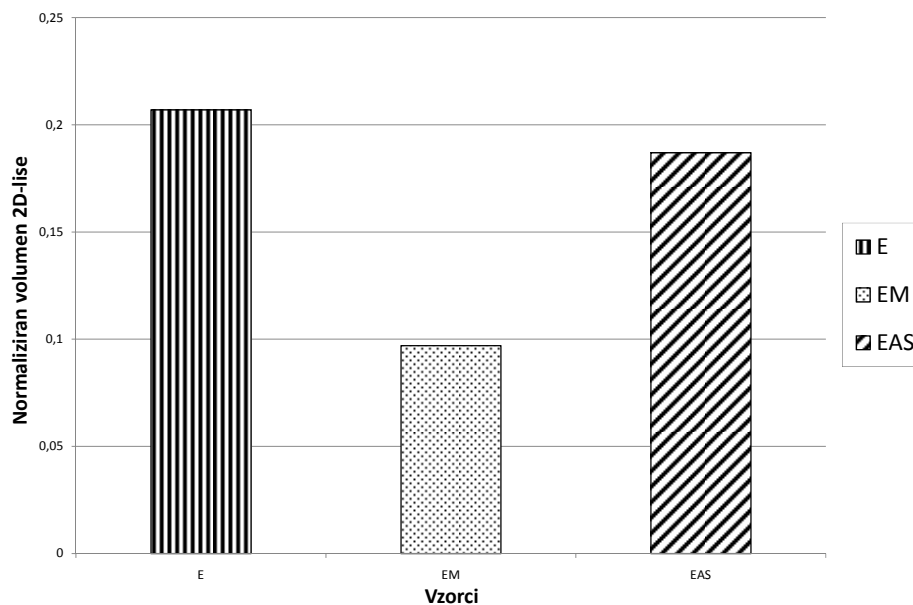
Analiza proteinskih profilov celic kvasovk, po zgornjih kriterijih je pokazala, da sta se intenziteti dveh 2-D lis značilno razlikovali med vzorcema E in EM (slika 15), in sicer 2-D lisa št. 1 za faktor 4,32 in 2-D lisa št. 2 za faktor 2,13 (slika 16). Primerjava normaliziranih volumnov ustreznih 2-D lis vzorca EAS ni pokazala značilne razlike v intenziteti 2-D lis.



Slika 15: Vpliv vode (A), ekstrakta nadliščka v vodi (B) in standardov skopolamina in atropina (C) na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae* (dodatek 0,5 ml)



Slika 16: Prikaz normaliziranih volumnov 2D-lise št. 1 kot posledica različnega vpliva vzorcev E, EM in EAS na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae*



Slika 17: Prikaz normaliziranih volumnov 2D-lise št. 2 kot posledica različnega vpliva vzorcev E, EM in EAS na proteinski profil kvasovke *S. cerevisiae*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za organizem *Saccharomyces cerevisiae* je značilna visoka stopnja ohranjenosti celičnih procesov med kvasovkami ter višje razvitimi organizmi (Parsons, 2003) in ravno to je tisto, zaradi česar smo kvasovko v naši nalogi uporabili kot orodje pri študiju vpliva zdravilnih učinkovin; ekstrakta nadliščka. Najzgodnejša točka, v kateri lahko kvasovke vključimo v potek raziskav pri odkrivanju novih zdravilnih substanc, je pri identifikaciji potencialnih tarč delovanja zdravilnih substanc (Huges, 2002). Zapise o zdravilnih učinkih nadliščka najdemo že v Bibliji, učinki atropina in skopolamina, dveh tropanskih alkaloidov, so že dolgo časa poznani v svetu medicine, kljub temu pa skrivnostni učinki nadliščka še do danes niso raziskani, tarče delovanja ekstrakta nadliščka so torej še vedno neznanka. Namen naše naloge je bil določiti ustrezne koncentracije ekstrakta nadliščka, ki ne bodo toksične za celice kvasovk, hkrati pa bodo dovolj visoke, da bodo povzročile spremembe v proteinskem profilu kvasovke v primerjavi z negativno kontrolo in bomo tako lahko določili specifične tarče delovanja.

Celice kvasovke smo v stacionarni fazi rasti izpostavili vzorcem: vino (V), ekstrakt nadliščka v vinu (VM) in ddH₂O (H₂O).

Pri dodatku 0,5 ml vzorca na 50 ml kvasne suspenzije (05V, 05VM in H₂O) nismo opazili bistvenih razlik glede živosti celic med primerjanimi vzorci. Intenziteta fluorescence je bila pri vseh analiziranih vzorcih primerljiva, večjih odstopanj ni bilo (slika 7). Dokaz, da dodani ekstrakti za celice kvasovk niso bili toksični, je bil predpogoj, da smo lahko nadaljevali s poskusom (2-D elektroforeza). V primeru, da bi se ekstrakti nadliščka izkazali za toksične, bi se posledično vklopili stresni odgovori kvasovk, kar bi se odrazilo tudi v spremembi proteinskega profila, to pa ni bil namen naše naloge.

Analizo proteinov celičnega ekstrakta kvasovke, tretirane z različnimi vzorci, smo izvedli z uporabo 2-D elektroforeze in nato pridobljene proteinske profile med seboj primerjali z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension.

Da smo spremembe v proteinskem profilu celic kvasovke lahko pripisali le ekstraktu nadliščka in ne zgolj vinu, v katerem je bil ekstrakt pripravljen, smo pri primerjavi normaliziranih volumnov 2-D lis (intenzitet) upoštevali zgolj tiste, pri katerih je bilo

razmerje normaliziranih volumnov posamezne 2-D lise, pri vzorcu vina in ekstraktu nadliščka v vinu, vsaj 1,5-kratno, hkrati pa se je morala intenziteta 2-D lise vzorca VM vsaj za faktor 1,5 razlikovati od intenzitete ustrezne 2-D lise pri vzorcu H₂O. Primerjava 2-D proteinskih profilov celičnega ekstrakta kvasovke je pri primerjavi vzorcev 05V, H₂O in 05VM pokazala, da se ti med seboj značilno razlikujejo v intenziteti ene 2-D lise (slika 10). Na podlagi obstoječe razlike med omenjenima proteinskima profiloma lahko izključimo vino kot vzrok za odražene spremembe proteinskega profila; razlika v intenziteti 2-D lis med primerjanima proteinskima profiloma 05V in 05VM je značilna, ustreza zgoraj navedenim pogojem.

Ker so bile razlike v proteinskem profilu celičnega ekstrakta kvasovke, tretirane z vzorci 05V, 05VM in H₂O minimalne, smo ponovili biološki poskus z istimi vzorci, tokrat v višjih koncentracijah, dodatek 5 mL vzorca na 45 mL suspenzije kvasovk v fosfatnem pufru (5V, 5VM in H₂O). Test živosti celic kvasovk tretiranih z vzorci 5V, 5VM in H₂O je pokazal, da vzorci dodani v teh koncentracijah, niso toksični za celice kvasovk (slika 8). Intenziteta fluorescence je bila primerljiva med vzorci, nekoliko višje odstopanje je vidno pri celicah kvasovke, tretirane z vzorcem 5V, živost je bila nižja v primerjavi z ostalima dvema vzorcema.

Primerjava 2-D proteinskih profilov celičnega ekstrakta kvasovke s programom 2-D Dymension je pri primerjavi vzorcev 5V, H₂O in 5VM ter ob upoštevanju prej opisanih kriterijih za izbor 2-D lise pokazala, da se ti med seboj značilno razlikujejo v intenziteti štirih 2-D elektroforetskih lis (slika 12). Intenzitete posameznih 2-D lis pri vzorcih 5V in 5VM so se razlikovale za sledeč faktor: 2,27 (2-D lisa št. 1); 2,70 (2-D lisa št. 2); 2,38 (2-D lisa št. 3); 2,10 (2-D lisa št. 4). Prav tako se je intenziteta ustrezne 2-D lise pri kontroli značilno razlikovala glede na 2-D liso vzorca 5VM, in sicer za sledeče faktorje: 1,74 (2-D lisa št. 1); 1,6 (2-D lisa št. 2); 1,86 (2-D lisa št. 3); 2,17 (2-D lisa št. 4).

Pri primerjavi proteinskih profilov med seboj je potrebno izpostaviti tudi zanimiv, različen vpliv vzorcev vina in ekstrakta nadliščka v vinu na intenziteto 2-D lise. Izkazalo se je, da je učinek ravno nasproten. Če je vzorec vina povečal intenziteto 2-D lise, potem jo je vzorec ekstrakta nadliščka v vinu zmanjšal (sliki 11 in 13), in obratno. Primerjana vzorca vina in

ekstrakta nadliščka v vinu dokazano različno vplivata na povečanje/zmanjšanje intenzitete izbrane 2-D lise, kar odraža različen vpliv vzorcev na proteinski profil kvasovke. Kateri so ti tarčni proteini, ne vemo, potrebna bi bila nadaljnja identifikacija z masno spektrometrijo.

Zapisi iz ljudske medicine govorijo o pripravi »opojne substance« nadliščka v vinu, čemur smo sledili tudi mi pri nastavitvi poskusa, hkrati pa smo želeli preveriti tudi ali bodo ekstrakti nadliščka v kontrolni raztopini (ddH₂O s 13 % (v/v) etanolom, s pH 3,4 uravnanim s koncentrirano citronsko kislino → E) imeli enak vpliv na kvasovke kot vzorec VM. Celice kvasovke smo izpostavili vzorcema: E in EM (ekstrakt nadliščka v 13 % (v/v) etanolu). Dodatno smo celice kvasovk tretirali tudi s standardnima raztopinama skopolamina in atropina (EAS) dodanima k vzorcu E, saj je iz literature znano, da nadlišček vsebuje med 0,3 % in 0,4 % tropanskih alkaloidov, kot so hiosciamin, hioscin (skopolamin) ter atropin (Nutton, 1996; Von Hintzenstern, 1989).

Test živosti celic kvasovk tretiranih z vzorci E, EM in EAS ni pokazal bistvenih razlik v intenziteti fluorescence pri primerjavi vseh treh vzorcev med seboj, iz česar lahko sklepamo, da dodani vzorci niso bili toksični za celice kvasovk (slika 14). Proteinski profil vzorca EAS glede na vzorec E (v primerjavi vzorca E na EM) ni pokazal značilnih razlik v intenziteti 2-D lis, iz česar lahko sklepamo, da dodana standarda atropina in skopolomana nimata sama po sebi vpliva na proteinski profil kvasovke ter, da je sinergistično delovanje substanc ekstrahiranih iz nadliščka, vzrok odraženih sprememb. Za značilno drugačno intenziteto 2-D lise smo določili take 2-D lise, pri katerih se je razmerje normaliziranih volumnov vzorca EM vsaj za faktor 1,5 razlikovalo od razmerja normaliziranih volumnov vzorca E oz. kadar so se razmerja normaliziranih volumnov med vzorcema E in EAS značilno razlikovala vsaj za faktor 1,5. Pri primerjavi proteinskih profilov med vzorci E, EM ter V, VM nismo opazili podobnosti, ti že na oko niso bili primerljivi, saj so 2-D lise, ki so prišle v upoštevek po prej opisanih kriterijih, na primerjanih 2-D gelih bile v različnih območjih tako molekulske mase kot tudi izoelektrične točke (sliki 12 in 15).

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* se je izkazala kot primeren model za proučevanje vpliva ekstraktov nadliščka na ravni proteoma.

5.2 SKLEPI

- ❖ Pri dodatku 0,5 ml vzorca (vino/ekstrakt nadliščka v vinu/voda) na 50 ml celične suspenzije kvasovk, smo opazili značilne spremembe v izražanju proteinov, ki so odraz delovanja ekstrakta nadliščka, zgolj pri enem proteinu.
- ❖ Pri dodatku 5 ml vzorca (vino/ekstrakt nadliščka v vinu/voda) na 45 ml celične suspenzije kvasovk, smo opazili značilne spremembe v izražanju proteinov, ki so odraz delovanja ekstrakta nadliščka na štirih proteinih.
- ❖ Ekstrakt nadliščka v vinu je glede na kontrolo (voda) pokazal ravno nasproten učinek na zvečanje/zmanjšanje intenzitete 2-D lise kot samo vino.
- ❖ Primerjava proteinskih vplivov celic kvasovke tretirane z ekstraktom nadliščka in standardnima raztopinama skopolamina in atropina je pokazala različen vpliv.
- ❖ Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* se je izkazala kot primeren model za proučevanje proteinskih tarč delovanja ekstrakta nadliščka.

6 POVZETEK

Z rastlino *Mandragora officinarum*, iz družine *Solanace*, so povezani številni magični obredi znani že iz obdobja antike, v zgodovini medicine pa je poznana predvsem kot močan narkotik ter analgetik. Različni deli rastline vsebujejo med 0,3 % in 0,4 % tropanskih alkaloidov, kot so hiosciamin, hioscin (skopolamin), atropin. Največkrat v literaturi zasledimo uporabo ekstraktov korena nadliščka namočenega v vinu (v kirurgiji ter pri pripravi čarobnih napojev). Z začetkom 19. stoletja so opustili uporabo nadliščka kot narkotika, zaradi nestandardiziranih koncentracij vsebnosti atropina in hioscina, še vedno pa ostajajo nepojasneni zdravilni učinki te »magične« rastline.

Kot primeren model za odkrivanje tarč delovanja zdravilnih učinkovin ter študija celične biologije se je izkazala kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo uporabili tudi v našem poskusu. Celice kvasovke smo v stacionarni fazi rasti izpostavili vzorcem: vino (V), ekstrakt nadliščka v vinu (VM) in ddH₂O (H₂O). Glavni namen naloge je bil določiti ustrezne koncentracije ekstrakta nadliščka, ki ne bodo toksične za celice kvasovk, hkrati pa bodo dovolj visoke, da bodo povzročile spremembe v proteinskem profilu kvasovke v primerjavi z negativno kontrolo in bomo tako lahko določili specifične tarče delovanja.

Živost celic smo preverjali z uporabo kompleta »LIVE/DEAD® Funga Light™ Yeast Viability Kit«. Za analizo proteinov celičnega ekstrakta kvasovke po izpostavitvi različnim vzorcem smo uporabili 2-D elektroforezo. Proteomiko namreč lahko vključimo v postopke odkrivanja novih zdravilnih učinkovin že v zgodnjih fazah razvoja, torej pri identifikaciji tarč delovanja zdravilnih učinkovin, in ovrednotenju vpliva zdravilne učinkovine na tarčo (Auerbach in sod., 2005). Test živosti celic kvasovk, tretiranih z vzorci vina (05V), ekstraktom nadliščka v vinu (05VM) in ddH₂O (H₂O), v dodatku 0,5 mL na 50 mL kvasne suspenzije v fosfatnem pufru je pokazal, da ni bistvenih razlik glede živosti celic kvasovk med primerjanimi vzorci. Pri primerjavi 2-D proteinskih profilov celičnega ekstrakta kvasovke vzorcev 05V, H₂O in 05VM smo določili eno 2-D elektroforetsko liso, pri kateri se je intenziteta lise (normalizirani volumni) med posameznimi vzorci značilno razlikovala. Razlike v proteinskem profilu celičnega ekstrakta kvasovke so bile minimalne, zato smo ponovili biološki poskus z istimi vzorci, tokrat v višjih koncentracijah, dodatek 5 mL vzorca na 45 mL kvasne suspenzije v fosfatnem pufru (5V, 5VM, H₂O). Test živosti je

potrdil, da vzorci dodani suspenziji kvasovk, za celice niso bili toksični. S primerjavo 2-D proteinskih profilov celičnega ekstrakta kvasovke s programom 2-D Dymension smo določili štiri 2-D lise, v katerih se omenjenimi vzorci med seboj značilno razlikujejo v intenziteti. Izpostaviti je potrebno, da sta imela vzorca vina in ekstrakta nadliščka v vinu ravno nasproten vpliv na intenziteto 2-D lise. Če je vzorec vina povečal intenziteto 2-D lise, potem jo je vzorec ekstrakta nadliščka v vinu zmanjšal in obratno.

Dodatno smo celice kvasovk tretirali tudi s standardnima raztopinama skopolamina in atropina, saj je iz literature znano, da nadlišček vsebuje med 0,3 % in 0,4 % tropanskih alkaloidov, kot so hiosciamin, hioscin (skopolamin) ter atropin. Analiza proteinskih profilov celičnih ekstraktov je pokazala, da atropin in skopolamin nista povzročila sprememb na ravni proteoma, zato je verjetno, da je za odražene spremembe v intenziteti 2-D lis odgovorno sinergistično delovanje substanc ekstrahiranih iz nadliščka.

Obstoječe razlike v intenziteti izraženih 2-D-lis so potrdile, da je kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* primeren model za odkrivanje novih tarč delovanja zdravilnih učinkovin, saj lahko s proteomskimi tehnika določimo vpliv delovanja na specifične proteine.

7 VIRI

- Alchemy works. 2004. *Mandragora officinarum* var. *Vernalis*. Newtown St., Alchemy works
http://www.alchemy-works.com/mandragora_officinarum.html (May 2009): 1 str.
- Anderson N.L., Anderson N.G. 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19:1853-1861
- Arroo R., Woolley J., Oksman-Caldenete K.M. 2007. Henbane, Belladonna, Datura and Duboisia. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 61: 189-197
- Auerbach D., Arnoldo A., Bogdan B., Fetchko M., Stagljari I. 2005. Drug discovery using yeast as a model organism: a functional genomic and proteomic view. *Current Proteomics*, 2: 1-13
- Bach T.J., Lichtenthaler H.K. 1983. Mechanisms of inhibition by mevlinol (MK 803) of microsome-bound radish and of partially purified yeast in HMG-CoA reductase (EC.1.1.1.34). *Zeitschrift für Naturforschung*, 38: 212-219
- Bassett Jr. D.E. Boguski M., Hieter P. 1997. Identifying human homologs of cell cycle genes using dbEST and WREFdb. *Methods in Enzymology*, 283: 128-140
- Bio-Rad Laboratories. 2000. Sypro ruby protein stains: Instruction manual. Hercules, Bio-Rad Laboratories: 13 str.
- Blomberg A., Blomberg L., Norbeck J., Fey S.J., Larsen P.M., Roepstoff P., Degand H., Boutry M., Posch A., Görg A. 1995. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradients two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 16: 1935-1945
- Bohinc P. 1992. Koren lečen koren strupen. Kulturna zgodovina naravnih učinkovin. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 198 str.
- Bowes B.J. 1989. Mandrake in the history of anaesthesia. V: The history of anaesthesia. Atkinson R.S., Boulton T.B. (eds.). London, The Parthenon Publishing Group, 134: 26-28

- Carroll P.M., Dougherty B., MacDonald P.R., Browman K., Fitzgerald K. 2003. Model system in drug discovery: chemical genetics meets genomic. *Pharmacology and Therapeutics*, 99: 183-220
- Carter A.J. 2003. Myths and mandrakes. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96: 144-147
- Celis J.E., Gromov P. 1999. 2D protein electrophoresis: can it be perfected?. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 16-21
- Corbett J.M., Wheeler C.H., Baker C.S., Yacoub M.H., Dunn M.J. 1994. The human myocardial two-dimensional gel protein database: update 1994. *Electrophoresis*, 15: 1459-1465
- Couper J.L. 1989. Anaesthesia with mandrake in the tradition of Dioskorides and its role in classical antiquity. V: *The history of anaesthesia*. Atkinson R.S., Boulton T.B. (eds.). London, The Parthenon Publishing Group, 134: 34– 38
- Damerval C., de Vienne D., Zivy M., Thiellement H. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7: 52-54
- Dimasi J.A. 2001. Risks in new drug development: approval success rates for investigational drugs. *Clinical Pharmacological Trends*, 69: 297-307
- Dimasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G. 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, 22: 151-185
- Dowsey A.W., Dunn M.J., Yang G.Z. 2003. High-throughput image analysis for proteomics. *Proteomics*, 3: 1567-1596
- Dräger B. 2006. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 67: 327-337
- Foury F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195,1,11:1-10

- A mandrake in vine bondage. 2008. San Francisco, Gallery of the absurd.
http://www.resplendentchaos.com/botany_in_wonderland/ (May 2009): 1 str.
- Garrels J.I. 1989. Building a foundation of protein knowledge to support post-genomic research: the bioknowledge library project. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 5269-5282
- Goffeau A. 2000. Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Letters*, 480: 37-41.
- Görg A. 2000. Advances in 2D gel techniques. *Trends in Biotechnology*, 18,1: 3-6
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harde A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology. *Proteomics*; 4: 3665-3685
- Granzier H.L.M., Wang K. 1993. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*, 14: 56-64
- Grlić L. 1989. *Svijet halucinogenih droga*. Zagreb, Globus: 216 str.
- Hanuš L.O. 2006. Comparative study of volatile compounds in the fresh fruits of *Mandragora autumnalis*. *Acta Chromatographica*, 17, 151-160
- Hanuš L.O., Řezanka T., Spížek J., Dembitsky V.M. 2005. Substances isolated from *Mandragora* species. *Phytochemistry*, 66, 20: 2408-2517
- Hartwell L. 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71: 543-546
- Hartwell L.H. 2004. Yeast and cancer. *Bioscience Reports*, 24: 523-544
- Hartwell L.H., Kastan M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science*, 266: 1821-1828
- Haugland R.P. 2002. Nucleic acid detection and genomics technology. V: *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 9th ed. Gregory J. (ed.). Eugene, Molecular Probes: 265-352

- Hilt J.Z., Byrne M.E. 2004. Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56,11: 1599-1620.
- Hughes T.R. 2002. Yeast and drug discovery. *Functional and Integrative Genomics*, 2: 199-211.
- Komel R., Kočevlar N., Rajševič U. 2008. Proteomika v medicinskih raziskavah in diagnostiki. V: *Proteomika. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost*, Ljubljana 31. januar – 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.: 33-44
- Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: *Proteomika. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost*, Ljubljana 31. januar – 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.: 19-44
- Kroll E.S., Hyland K.M., Hieter P., Li J.J. 1996. Establishing genetic interactions by a synthetic dosage lethality phenotype. *Genetics*, 143: 95– 102
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921
- Lee M.R. 1999. Saint John's wort (*Hypericum perforatum*) A balm for hurt minds? *Proceedings of Royal College of Physicians of Edinburgh*. 29:253–257
- Lee MR. 2006. The Solanaceae II: the mandrake (*Mandragora officinarum*); in league with the devil. *Journal Royal College Physicians of Edinburgh*, 36: 278-285
- López J.L. 2006. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B*, 849: 190-202
- Lubec G., Krapfenbauer K., Fountoulakis M. 2003. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in Neurobiology*, 69, 2: 193-211
- Menacho M.M., Murguía J.R. 2007. Yeast on drugs: *Sacharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clinical and Translational Oncology*, 9: 1-9

- Nutton V. 1996. The rise of medicine. V: Cambridge illustrated history of medicine. Porter R. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 52– 81
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 250: 4007-4021
- Parsons A.B, Geyer R., Hughes T.R., Boone C. 2003. Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. Progress in Cell Cycle Research, 5: 159-166
- Peduto V.A. 2001. The mandrake root and the Viennese dioscorides. Minerva Anesthesiology, 67: 751-766
- Pennisi E. 2003. Human genome. A low number wins GeneSweep pool. Science, 300: 1484-1484
- Rabillound T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. Electrophoresis, 17: 813-829
- Rabillound T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics, 2: 3-10
- Ramoutsaki I.A., Askitopoulou H., Konsolaki E. 2002. Pain relief and sedation in Roman Byzantine texts: *Mandragoras officinarum*, *Hyoscyamos niger* and *Atropa belladonna*. International Congress Series, 1242: 43-50
- Reiter Y., 2001. Recombinant immunotoxins in target cancer cell therapy. Advances in Cancer Research, 81: 93-124
- Rubin G.M., Lewis E.B. 2000. A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. Science, 287: 2216– 2218
- Sturgeon C.M., Kemmer D., Anderson H.J., Roberge M. 2006. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. Biotechnology Journal, 1: 289-298
- Tannu N.S. Sanchez-Brambila G., Kirby P., Andacht TM. 2006. Effect of staining reagent on peptide mass fingerprinting from in-gel-trypsin digestions: a comparison of SyproRuby and DeppPurple. Electrophoresis. 27: 3136-3143

- Terrett N.K., Bell A.S., Brown D., Ellis P. 1996. Sildenafil (VIAGRA™), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6, 15: 1819-1824
- Tugendreich S., Tomhiel J., Earnshaw W., Hieter P. 1995. CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell*, 81,2,21: 261-268
- Valvasor J. V. 1968. Slava vojvodine Kranjske: izbor. Ljubljana, Mladinska knjiga: 155 str.
- VanBogelen R.A., Greis K.D., Blumenthal R.M., Tani T.H., Matthews R.G. 1999. Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends in Microbiology*, 7, 8: 320-328
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M.D., Evans C A., Holt R.A. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 16: 1304–1351
- Von Hintzenstern U. 1989. Anaesthesia with mandrake in the tradition of Dioskorides and its role in classical antiquity. V: The history of anaesthesia. Atkinson R.S., Boulton T.B. (eds.). London, The Parthenon Publishing group, 134: 38– 40
- Waniakowa J. 2007. Mandragora and Belladonna – the names of two magic plants. *Studia linguistica. Univesitatis Iagellonicae Cracoviensis*, 124: 161-173
- Poweful grace lies in herbs and plant. 1998. St Luis, Washington University School of Medicine
<http://beckerexhibits.wustl.edu/Herbal/1/7.html> (May 2009): 1-1
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., C.A. Poljak, Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Smith H.I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16: 1090-1094

- Winzeler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S.H., Gentalen E., Giaver G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonal P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Strosms R.K., Véronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M., Dawis R.W. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285: 901-906
- Wolf D.H. 2004. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 1601-1614
- Zhu H., Sbyder M. 2002. »Omic« approaches for unreaveling signalling networks. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 173-179

ZAHVALA

Zahvaljujem se Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti, ki mi je omogočila izvedbo diplomskega dela.

Prof. dr. Petru Rasporju kot mentorju diplomske naloge, hvala za koristne nasvete pri pisanju diplomske naloge in hvala, ker ste me naučili drugačnega razmišljanja.

Dr. Romanu Paškulinu, ker me je navdušil za diplomsko nalogo.

Prof. dr. Maji Ravnikar za hiter pregled diplomske naloge in koristne nasvete.

1000-krat hvala doc. Poloni Jamnik za ogromno posredovanega znanja, nasvetov pri izvedbi diplomskega dela, dobro vodstvo in veselje ter dobro voljo na vsakem najinem sestanku, ne glede na to skozi kakšno težko temo sva se morali prebiti.

Hvala ekipi na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil: Dragici, za premostitev vseh birokratskih ovir, Mateju, za računalniško podporo, Katarini, Juretu za pozitivno energijo in vzpodbu ter vsem s katerimi smo se srečevali na hodnikih in v laboratoriju.

Hvala gospe Ivici Hočevnar in Lini Burkan za pomoč pri navajanju referenc in oblikovnemu izgledu diplomske naloge.

Hvala gospe Selmi Huhar in Mariju Pintar za pomoč in hitremu posredovanju pri urejanju birokratskih dolžnosti.

Hvala Blažu, ker si z mano delil dobre in slabe dni, za tvojo podporo na poslovni in osebni poti, za vse tvoje nasvete in hvala, ker mi vedno stojiš ob strani.

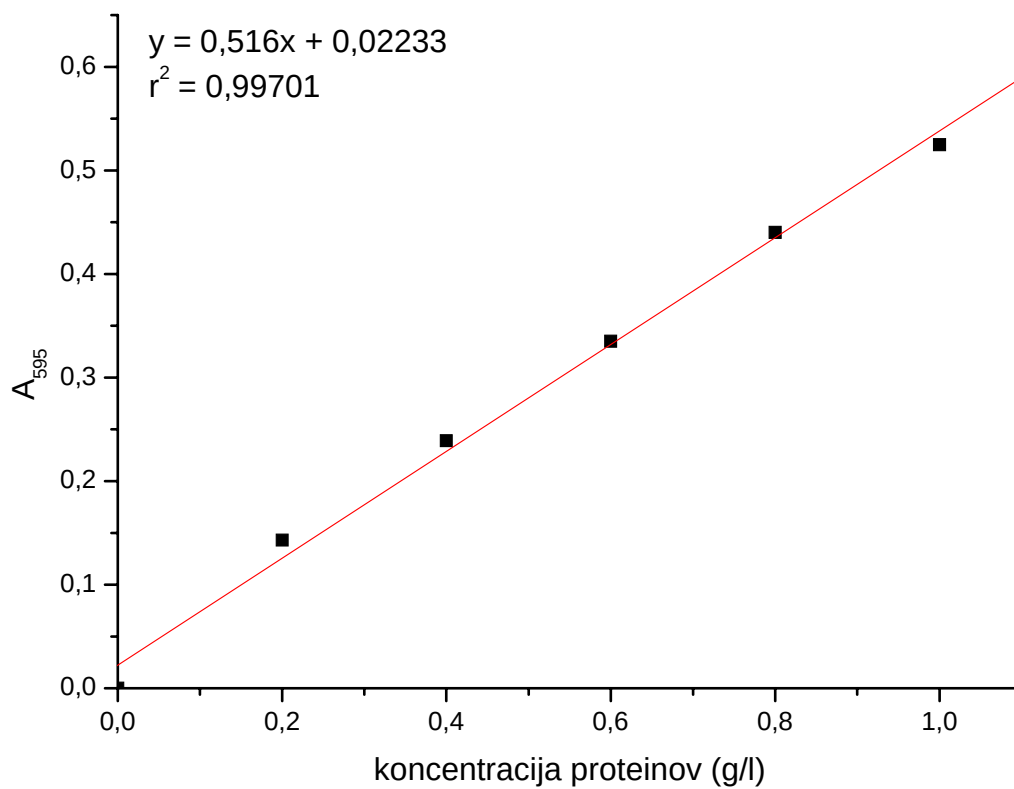
Hvala kolegom mikrobiologom: Vesni, Nejcu, Roku, Daliborki, Simoni, Matiju; za vašo vzpodbudo, še posebej hvala Katarini, da je vskočila na pomoč, ko sem jo najbolj potrebovala.

Alešu, za tehnično realizacijo diplomskega dela in za podporo na moji poti.

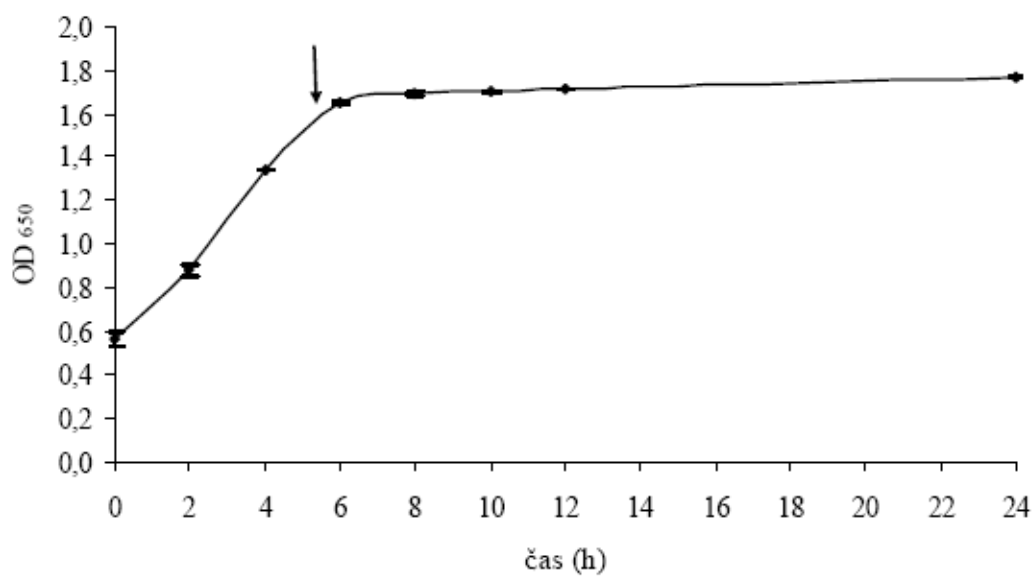
Hvala sodelavcem na MSDju za pridobljenje izkušnje in znanja.

In na koncu največjo zahvalo dolgujem svoji mami Ani za to, da je verjela vame, da mi je omogočila študij in najlepša študentska leta, za vso tvojo ljubezen, skrb in podporo. Hvala, ker mi stojiš ob strani.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu



Priloga B: rastna krivulja (aerobna submerzna kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku – vd = 100 ml, T 28°C, 200 obrt./min)

Priloga C: Prikaz razmerja normaliziranih volumnov ter normaliziranih volumnov izbranih 2-D lis pri primerjavi proteinskih profilov kvasovke *S. cerevisiae* tretirane z vodo (H₂O), vinom (05V) in ekstraktom nadliščka v vinu (05VM) (dodatek 0,5 mL)

Št. 2D-lise	05V		H ₂ O			05VM	
	05V/05V	volumen	05V/H ₂ O	05VM/H ₂ O	volumen	05V/05VM	volumen
1	1	0,53	-2,16	1,84	0,25	-1,18	0,45
2	1	0,09	2,02	3,19	0,23	-1,38	0,74
3	1	0,09	1,87	1,31	0,17	2,43	0,22
4	1	0,18	3,06	-3,42	0,54	-1,12	0,16
5	1	0,48	-1,41	-1,67	0,34	-2,36	0,20

Priloga D: Prikaz normaliziranih volumnov ter volumnov izbranih 2D lis pri primerjavi proteinskih profilov kvasovke *S. cerevisiae* tretirane z vodo (H₂O), vinom (5V) in ekstraktom nadliščka v vinu (5VM) (dodatek 5 ml)

Št. 2D-lise	5V		H ₂ O			5VM	
	5V/5V	volumen	5V/H ₂ O	5VM/H ₂ O	volumen	5V/5VM	volumen
1	1	0,063	4,69	-1,27	0,304	3,713	0,239
2	1	0,032	-3,164	-1,24	0,173	-2,341	0,139
3	1	2,119	2,747	1,06	5,941	2,938	6,31
4	1	1,394	-2,392	-1,09	0,62	-2,45	0,569
5	1	0,298	3,908	-1,74	1,188	2,268	0,684
6	1	0,371	-1,695	-1,6	0,224	-2,696	0,14
7	1	0,182	-1,28	-1,86	0,145	-2,375	0,078
8	1	1,056	-2,17	-1,78	0,497	-2,103	0,279

Priloga E: Prikaz normaliziranih volumnov ter volumnov izbranih 2D lis pri primerjavi proteinskih profilov kvasovke *S. cerevisiae* tretirane z vodo (05E), ekstraktom nadliščka v vodi (05EM) in standardoma skopolamina in atropina v vodi (05EAS) (dodatek 0,5 ml)

Št. lise	E		EM		EAS	
	norm.vol.R	volumen	norm.vol.R	volumen	norm.vol.R	volumen
1	1	0,174	-4,316	0,04	-1,532	0,114
2	1	0,207	-2,133	0,097	-1,106	0,187