

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTJA MIGLAR

IZOLACIJA BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI IZ RDEČEGA VINA IN UGOTAVLJANJE
NJIHOVIH UČINKOV NA G-PROTEINE

ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM THE RED WINE
AND DETERMINATION OF THEIR EFFECTS ON G-PROTEINS

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta ter na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod somentorstvom prof. dr. Matjaža Zorka.

Zahvale

Iskrena hvala mentorju prof. dr. Samu Kreftu in doc. dr. Damjanu Janešu za pomoč in nasvete med izdelavo vinskih ekstraktov v laboratoriju in koristne napotke pri izdelavi diplomske naloge.

Iskrena hvala somentorju prof. dr. Matjažu Zorku za možnost realizacije diplomskega dela na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete, usmerjanje med laboratorijskim delom, odgovarjanje na številna vprašanja in za vso pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Hvala Maji Anko za napotke in uvajanje v delo s celičnimi kulturami.

Hvala Klavdiji Makovec za pomoč pri pripravi puferskih raztopin.

Hvala Katji Štern in Lovru Vidmarju za uporabo njenega grafa (Slika 14) in pomoč.

Hvala znan. sod. dr. Gorazdu Drevenšku za uporabljene kortekse podgan.

Hvala izr. prof. dr. Mariji Bogataj in doc. dr. Marku Anderluhu za pregled diplomske naloge.

Hvala kolegici Barbari Solar za mnoge nasvete pri izdelavi naloge.

Za pomoč bi se zahvalila še osebu iz katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo in Nevenki Klenovšek iz Inštituta za biokemijo Medicinske fakultete.

In seveda hvala družini, fantu Tomiju in prijateljem za neskončno podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom prof. dr. Matjaža Zorka.

Ljubljana, oktober 2010

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh

VSEBINA

POVZETEK	6
SEZNAM OKRAJŠAV.....	7
1. UVOD	8
1.1 Kemijska sestava vina	8
1.2 Polifenoli	11
1.2.1 Flavonoidi.....	12
1.2.2 Neflavonoidi.....	16
1.2.3 Polifenoli in srčno-žilna obolenja	18
1.3 Mehanizem krčenja in sprostitve gladkih mišičnih celic	19
1.4 Zgradba in delovanje G-proteinov	22
1.4.1 Heterotrimerni G-proteini	22
1.4.2 Monomerni G-proteini	25
1.4.3 Mehanizem delovanja heterotrimernih G-proteinov	25
1.5 Delovanje snovi iz rdečega vina na G-proteine	28
2. NAMEN DELA.....	30
3. MATERIALI IN METODE	31
3.1 Reagenti, aparature, pribor in oprema.....	31
3.2 Priprava frakcij vina Cabernet Sauvignon (Goriška Brda)	35
3.3 Priprava membran iz možganske skorje podgan.....	35
3.4 Protokol za gojenje celic sf9	36
3.5 Izražanje rekombinantnih G-proteinov	37
3.6 Določanje hitrosti vezave [³⁵ S]GTPγS na G-proteine.....	38

3.7	Obdelava podatkov.....	39
4.	REZULTATI.....	40
4.1	Izolacija frakcij vina.....	40
4.2	Redčenje frakcij vina.....	40
4.3	Test ustreznosti membran.....	41
4.4	Vpliv topil	43
4.5	Pregled vpliva velikih koncentracij vseh frakcij na G–proteine iz podganjega korteksa	45
4.6	Pregled vpliva enakih koncentracij vseh frakcij na Gs in Gi – proteine	46
4.7	Vpliv petroletrne frakcije vina na proteine Gs	49
4.8	Vpliv dietiletrne frakcije vina na proteine Gs	50
4.9	Vpliv etilacetatne frakcije vina na proteine Gs	51
4.10	Vpliv butanolne frakcije vina na proteine Gs.....	52
4.11	Vpliv vodne frakcije vina na proteine Gs.....	53
4.12	Vpliv petroletrne frakcije vina na proteine Gi	54
4.13	Vpliv dietiletrne frakcije vina na proteine Gi.....	55
4.14	Vpliv etilacetatne frakcije vina na proteine Gi.....	56
4.15	Vpliv butanolne frakcije vina na proteine Gi	57
4.16	Vpliv vodne frakcije vina na proteine Gi	58
5.	RAZPRAVA	59
5.1	Izolacija frakcij vina.....	59

5.2	Vpliv posameznih topil na aktivnost G-proteinov	59
5.3	Vpliv frakcij vina na aktivnost G-proteinov	60
5.4	Primerjava naših rezultatov z izsledki podobnih raziskav	62
5.5	Posredno ali neposredno delovanje snovi iz vina na G-proteine	63
5.6	Predlogi za nadaljnje delo	63
6.	SKLEP.....	65
7.	LITERATURA.....	66

POVZETEK

Vino velja za eno izmed najstarejših zdravil, ki ga je sodobno zdravstvo do nedavnega zavračalo, v zadnjem času pa se spet vedno bolj zavedamo koristnih učinkov zmernega pitja vina, posebno rdečega. Leta 1992 so francoski znanstveniki predstavili izraz francoski paradoks, da bi pokazali na vpletenost vina, ki pomembno zavira proces nastajanja srčno-žilnih obolenj kot posledico prehrane s preveliko vsebnostjo maščob.

Ta varovalen učinek danes pripisujemo polifenolom, ki jih je v belem vinu 40-400 mg/L, v rdečem pa 300-4000 mg/L, zaradi svojih antioksidativnih lastnosti pa pomagajo pri vseh boleznih, povezanih z oksidativnim stresom, kot so rak, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni.

V tem diplomskem delu se osredotočamo na vpliv frakcij rdečega vina (Cabernet Sauvignon) na G-proteine. Frakcije smo pripravili tako, da smo vino zaporedno ekstrahirali s štirimi različno polarnimi topili (petroleter, eter, etilacetat, butanol in vodni preostanek). Namen našega dela je ugotoviti, ali naše frakcije značilno vplivajo na aktivnost G-proteinov in katera frakcija ima največji vpliv.

Kot vir G-proteinov smo uporabili membrane iz korteksa podganjih možganov ter membrane celic sf9, v katerih smo izrazili rekombinantne heterotrimerne goveje G-proteine tipa G_s in G_i . Prve imajo to prednost, da so G-proteini v njih povsem fiziološki, vendar obenem to slabost, da so tam hkrati prisotne številne vrste G-proteinov. Druge imajo to prednost, da vsebujejo samo določeno vrsto G-proteinov v velikem presežku.

Aktivnost G-proteinov smo merili radiometrično z rahlo modificirano McKenzijevo metodo, in sicer smo izmerili začetno hitrost vezave radioaktivno označenega analoga gvanozintrifosfata na podenoto α G-proteinov, saj nam ta podatek pove, v katerem stanju se G-protein nahaja. Ko so G-proteini aktivirani, je začetna hitrost vezave večja, ko so inhibirani, pa manjša od bazalne vrednosti.

Rezultati jasno kažejo, da različne vinske frakcije aktivirajo ali inhibirajo G-proteine na različen način, hkrati pa je stopnja aktivacije ali inhibicije odvisna od vrste uporabljenih G-proteinov.

Največji vpliv na aktivnost G-proteinov smo opazili pri etilacetatni frakciji, sledi ji vodna, aktivnost pa kaže tudi butanolna frakcija. Interpretacija dobljenih rezultatov in njihova korelacija s fiziološkimi učinki frakcij ni enostavna, dobili pa smo vpogled, za katere frakcije in katere potencialne mehanizme delovanja bi bilo smiselno nadaljnje testiranje.

SEZNAM OKRAJŠAV

AC – adenilatna ciklaza

ATP – adenzintrifosfat

$[Ca^{2+}]_i$ – koncentracije kalcijevih ionov v gladkih mišičnih celicah

Ca^{2+} - CaM – kompleks kalcija in kalmodulina

CaM – kalmodulin

cAMP – ciklični adenzinmonofosfat

cGMP – ciklični gvanozinmonofosfat

cpm – enota za radioaktivnost (counts per minute)

DAG – diacilglicerol

D₁, D₂ rec. – dopaminski receptorji podtipov D₁, D₂

DTT – ditiotreitrol

EC₅₀ – koncentracija liganda, ki povzroči 50% maksimalnega učinka

eNOS – endotelijska konstitutivna NO sintaza

GDP – gvanozin 5'-O-difosfat

GIT – gastrointestinalni trakt

GTP – gvanozin 5'-O-trifosfat

H₁, H₂, H₃ in H₄ rec. – histaminski receptorji podtipov H₁, H₂, H₃ in H₄

5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₆ in 5-HT₇ rec. – serotoninški receptorji podtipov 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₆ in 5-HT₇

IP₃ – inozitol 1,4,5-trifosfat

IP₃R – receptor za IP₃

LDL – lipoproteini nizke gostote (low density lipoproteins)

M₁, M₂, M₃, M₄ in M₅ rec. – muskarinski receptorji podtipov M₁, M₂, M₃, M₄ in M₅

MLCK – kinaza lahke verige miozina

NO – dušikov oksid

PIP₂ – fosfatidilinozitol 4,5-difosfat

α_1 -rec. – adrenergični receptorji podtipa α_1

RyR – rianodinski receptor

SERCA – sarkoplazmatski retikulum - Ca^{2+} -ATPaza

SR – sarkoplazmatski retikulum

$[^{35}S]GTP\gamma S$ – radioaktivni gvanozin 5'-O-[γ -tio]trifosfat

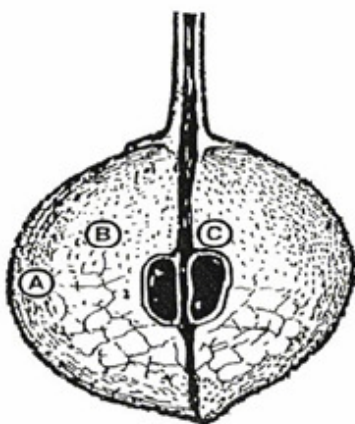
1. UVOD

1.1 Kemijska sestava vina

Vino je pijača, ki jo pridobivamo s kontroliranim alkoholnim vrenjem iz grozdja plemenite vinske trte *Vitis vinifera*. Kot velja za vsa živila, je vino po svojem učinku na človeški organizem med živilom, poživilom in strupom, odvisno od zaužite količine. Že od nekdaj pa ga uporabljamo tudi kot zdravilo. (1)

Kemična sestava vina je zelo zapletena in odvisna od mnogih dejavnikov. To so sorta grozdja, lega in vrsta zemljišča, vremenske razmere, zrelost in zdravje grozdja, način predelave in nega vina. Vse vrste vina vsebujejo skoraj enake sestavine, velike razlike pa so v količini prisotnih snovi. (2)

Vino se sme izdelovati le iz grozdja, pridelanega na absolutnih vinogradniških legah iz priporočenih in dovoljenih sort vinske trte za določeno pridelovalno območje, ki dosega predpisano sladkorno stopnjo ter ostale predpisane parametre kot so količina organskih kislin, dušikovih spojin in aromatičnih snovi. Zorenje grozdja spoznamo po povečanju količine sladkorja in zmanjšanju količine skupnih kislin. Glede na čas dozorevanja grozdja so vinske sorte zgodnje, srednje in pozno zoreče. Grozdje sestavljajo jagode, v katerih sta grozdno meso in sok, jagodne kožice, pečke, jagodni in grozdni pecelj (Slika 1).



A: Epikarp (jagodna kožica) bogata na taninih in antocianinih, revna na sladkorju

B: Mezokarp (grozdni sok) bogat na sladkorju in kislinah, reven na taninih in antocianinih

C: Endokarp (pečke) bogat na taninih, reven na sladkorju in antocianinih

Slika 1: Sestava grozdne jagode (3)

Sestava vina:

Različna strokovna literatura navaja različne podatke in poudarja zapletenost kemične sestave, to pa potrjuje tudi dejstvo, da kljub izrednemu napredku analitskih metod še vedno ni enotnih podatkov. Vino tako sestavlja najmanj 400 nehlapnih komponent (nehlapni ekstrakt) in še najmanj toliko hlapnih snovi, vendar izmed vseh le nekatere presegajo koncentracijo 100 mg/L. To so voda, etanol, glicerol, sladkorji, organske kisline, proteini, minerali in fenolne spojine. Le-te komponente tudi najbolj vplivajo na okus vina.

◆ **Voda**

V vinu je do 85% vode, ki je pomembna kot topilo za organske in anorganske snovi. Voda je nujna komponenta pri mnogih biokemijskih reakcijah med zorenjem grozdnih jagod, pri reakcijah fermentacije in pri staranju vina.

◆ **Sladkorji**

V grozdnem soku sta večinoma prisotni glukoza in fruktoza, ki med fermentacijo prevrevata v etanol in ogljikov dioksid. Glede na razmerje med neprevretim sladkorjem in kislinami uvrščamo vina med suha, polsuha, polsladka in sladka.

◆ **Alkoholi**

Prevladuje etanol, prisotni so še metanol, glicerol in drugi višji alkoholi – propanol, butanol, sladkorni alkoholi in drugi. Slovenska vina vsebujejo med 8–14% alkohola. V mladih vinih je stopnja alkohola višja, s staranjem pa ga nekaj oksidira, nekaj esterificira in nekaj izhlapi. Strupeni metanol je prisoten v majhnih količinah in nastane pri vrenju iz pektina. Glicerol daje vinu poln okus in ga je prepovedano umetno dodajati. Alkohol je poleg kisline v vinu naravna zaščita, da se vino ne pokvari.

◆ **Kisline**

Kisline v vinu sestavljajo proste organske in anorganske kisline in njihove soli. Nehlapne organske kisline v vinu so vinska, jabolčna, mlečna, jantarjeva in citronska, med hlapnimi pa je predvsem očetna. Najpomembnejše anorganske kisline so: fosforjeva, žveplova in klorovodikova. Količina kislin v vinu je med 4 in 14 g/L, dopustna količina hlapnih kislin pa do 2,0 g/L. Delež nehlapnih kislin, ki jih imenujemo titracijske kisline, pri slovenskih vinih značilno variira. Najnižja vrednost le-teh je 4,5g/L, najvišja pa 13g/L (teran).

Primerno kislina vina so sveža, polnega vonja in okusa ter so bolj odporna proti boleznim kot manj kislina.

◆ **Aromatične snovi**

Aromatične ali buketne snovi dajejo vinu značilen vonj in okus. V splošnem je skupna vsebnost aromatičnih snovi v litru vina med 0,8 – 1,2g. Po svojem izvoru so primarne in pridejo v vino s predelavo posamezne vinske sorte grozdja, sekundarne (aromatični estri, nastali z reakcijo med kislinami in alkoholi), ki nastanejo med alkoholnim vrenjem in terciarne buketne snovi, ki se oblikujejo med zorenjem vina v steklenici.

Leta 2005 je Hayasaka s pomočjo sklopljene tehnike plinske kromatografije in masne spektroskopije izoliral in identificiral več kot 700 buketnih snovi iz različnih vin, med njimi več kot 160 različnih estrov. (5)

◆ **Polifenoli**

V rdečih vinih najdemo značilno več polifenolov kot v belih, in sicer je njihova celokupna povprečna količina 300-4000 mg/L, medtem ko je v belih vinih povprečno 40-400mg/L polifenolov. (6)

◆ **Vitamini**

Prevladujejo vitamini B-kompleksa.

◆ **Mineralne snovi**

Navadno so prisotne v obliki soli. Največ je kalija, ki je z vinsko kislino vezan v kislino kalijev tartrat. Ostale mineralne snovi so še Ca, Na, Mg, Fe, Cu, karbonati, fosfati, kloridi in sulfati. Trta skupaj z vodo črpa iz zemlje mineralne in druge snovi in tako lahko z jedrsko magnetno resonanco (NMR) ugotovimo provenienco oziroma geografsko poreklo vina. (4)

◆ **Dušikove spojine**

Beljakovine, aminokisliline, amidi in amini.

Vino je zaradi zapletene sestave nemogoče ponarediti, saj bi proizvodnja zahtevala preveč kemikalij in bi bila znatno dražja od naravnega proizvoda, zaradi izboljšanja lastnosti pa mu

trgovci pogosto dodajajo razne snovi, tako da je proizvodnja vina v vseh vinogradniških državah izpostavljena najstrožji inšpekcijski kontroli. Nikjer drugje ni tolikšne pestrosti v kakovosti kot prav pri vinu, zato tudi za noben drug prehranski izdelek ni tolikih zakonskih predpisov. (2)

1.2 Polifenoli

Polifenoli so rastlinski sekundarni metaboliti z različnimi vlogami, živali jih ne sintetizirajo. So pomembna komponenta vina, saj lahko v telesu sprožijo različne fiziološke učinke. Polifenole sestavljajo eden ali več aromatskih obročev z vezanimi hidroksilnimi skupinami. Število in lega hidroksilnih skupin pomembno vpliva na antioksidativne lastnosti. V naravi so polifenoli pogosto glikozilirani, pojavljajo pa se tudi kot estri z organskimi kislinami. Glede na osnovno kemijsko zgradbo razdelimo polifenole na:

1. flavonoide: flavonoli, flavanoli oz. flavan-3-oli in antociani
2. ne-flavonoide: derivati 4-hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojske kisline in stilbeni. (6)

Večina polifenolov v vinu izvira iz grozdja, predvsem iz pečk in kožice, manjši del pride iz lesenih sodov, še manjši delež polifenolov pa nastane med fermentacijo vina. V glavnem velja, da rdeče vino nastaja s fermentacijo grozdnega soka in jagod, belo pa samo s fermentacijo grozdnega soka, zato vsebuje rdeče vino več polifenolov. Tabela 1 prikazuje tipične količine polifenolov v rdečem vinu.

Tabela 1: Tipične količine polifenolov v vinu (mg/L). Mlado vino je staro 6 mesecev, staro vino pa približno 2 leti. (Povzeto po 6)

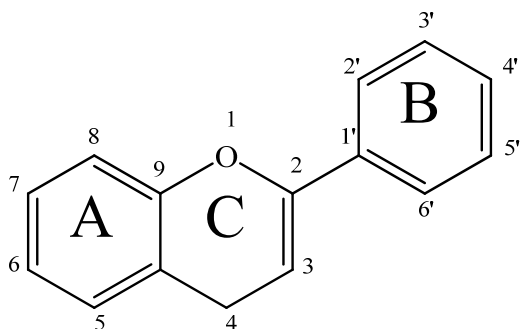
	Mlado vino	Staro vino
<u>Ne-flavonoidi</u>		
Hidroksicinamati	165	60
Benzojske kisline	60	60
Hidrolizirajoči tanini	0	250
Stilbeni	7	7

Skupaj	232	377
<u>Flavonoidi</u>		
Flavanolni monomeri	200	100
Proantocianidini in kondenzirani tanini	750	1000
Flavonoli	100	100
Antociani	400	90
Drugi	50	75
Skupaj	1500	1365
Totalni fenoli	1732	1742

Da lahko polifenolna spojina povzroči v človekovem telesu učinek, mora imeti ustrezno biorazpoložljivost, ki pa je odvisna od mnogih dejavnikov.(7) Polifenoli imajo raznolike kemijske strukture, zato se biorazpoložljivost razlikuje od spojine do spojine. Iz preglednice vidimo, da velik delež polifenolov v vinu tvorijo velike polimerizirane molekule, ki se zaradi svoje velikosti slabo absorbirajo, kar nam pravi, da najbolj zastopani polifenoli niso nujno tisti z največjim učinkom.

1.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine, zgrajene iz 15 C-atomov, osnovno strukturo molekule imenujemo 2-fenilbenzopiran oz. flavan. (Slika 2). Flavonoidi v vinu so večinoma glikozidi, sladkor (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza) je vezan na C₃, lahko pa tudi na C₅ ali C₇. Posamezni flavonoidi se med seboj razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega obroča (na mestu C₄) in po različnih substituentih na obroču. V rdečih vinih predstavljajo več kot 85% vseh fenolnih spojin, v belih pa le približno 20%. (5)



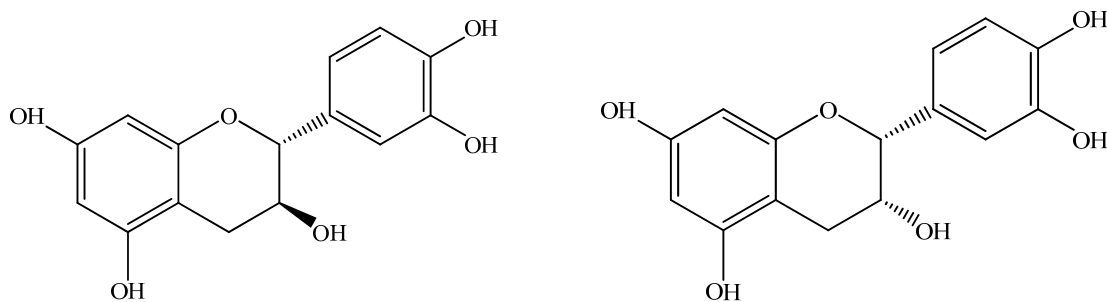
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (6)

Flavonoidom pripisujemo širok spekter bioloških učinkov, med drugim vazodilatatorno in močno antioksidativno delovanje. Najpogostejši flavonoidi v vinu so flavan-3-oli, flavonoli, proantocianidini in antociani (8).

◆ Flavan-3-oli

Monomerni, oligomerni (proantocianidini) in polimerni (kondenzirani tanini) flavan-3-oli so najpomembnejši fenoli v rdečih vinih. V skupino flavan-3-olov prištevamo katehin (*trans* oblika) in epikatehin (*cis* oblika), ki ju vidimo na Sliki 3. Vrednosti monomernih flavan-3-olov se v rdečih vinih gibljejo okoli 40-120 mg/L, večinoma gre za katehin. Poleg teh dveh pa v vinu najdemo še dva flavan-3-ola, vendar v nizkih koncentracijah. Galokatehin ima na B-obroču osnovne strukture 3',4',5'- trihidroksi skupino, epikatehin galat pa je ester epikatehina in galne kisline na 3-OH skupini. (6)

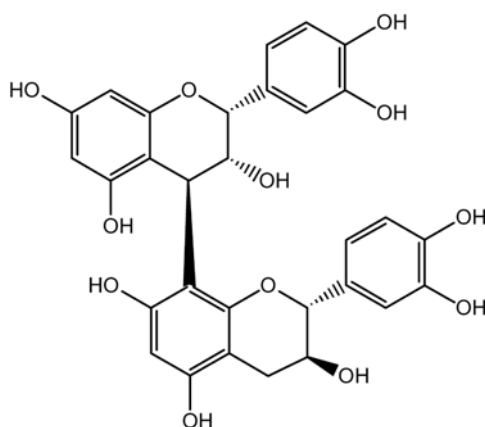
Flavan-3-oli delujejo kot močni antioksidanti.



Slika 3: Strukturni formuli katehina in epikatehina (6)

◆ Proantocianidini

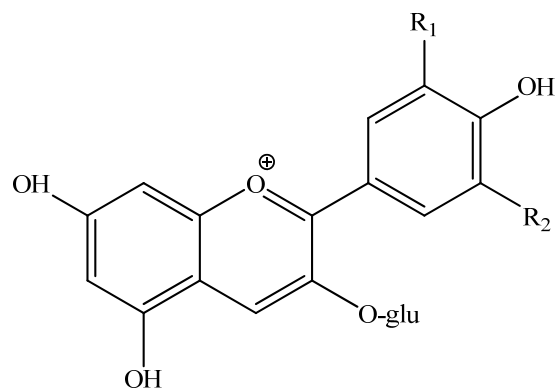
Proantocianidini so di-, tri- in tetrameri flavan-3-olov. Vsebnost flavan-3-olov in proantocianidinov je močno sortno pogojena. V rdečih vinih se gibljejo koncentracije od 120 do 3500 mg/L. Sorte si sledijo ponavadi v tem vrstnem redu: cabernet sauvignon > modri pinot > merlot (8). Primer proantocianidinskega dimera prikazuje Slika 4.



Slika 4: Proantocianidinski dimer (6)

◆ Antociani

Druga najpomembnejša skupina v rdečih vinih so antociani (Slika 5), ki dajejo rdečemu vinu barvo. Kemijsko so antocianidini, povezani z glukozo. Sladkorna komponenta poveča kemijsko stabilnost in vodotopnost teh snovi. Osnova njihove zgradbe je 3,5,7-trihidroksibenzopiran z različnim številom hidroksilnih in metoksilnih skupin na 2-fenilnem obroču. Modri odtenek narašča s številom hidroksi skupin, rdeči pa s številom metoksi skupin. V vinu najdemo le 3-monoglikozide. (5)

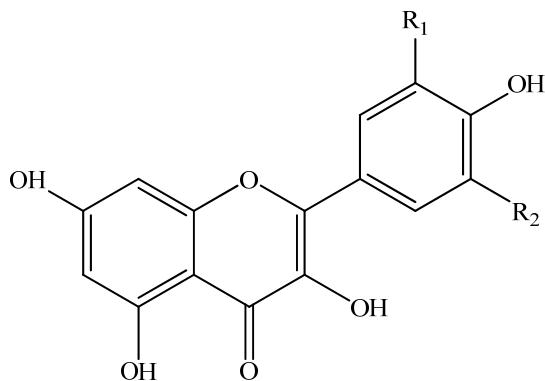


Slika 5: Strukturna formula antocianov (6)

Ime antociana	R ₁	R ₂
Cianidin	H	OH
Peonidin	H	OCH ₃
Delfinidin	OH	OH
Petunidin	OH	OCH ₃
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

◆ Flavonoli

Kemijsko opišemo flavonole kot 3-glikozide ali 3-glukoronide, najpomembnejša flavonola v rdečem vinu sta kvercetin-3-glikozid in kvercetin-3-glukoronid. Posamezne flavonole ločimo med sabo glede na substituentne, ki so vezani na benzenov obroč na mestih 3 in 5. (6) Strukturno formulo flavonolov predstavljamo na Sliki 6.



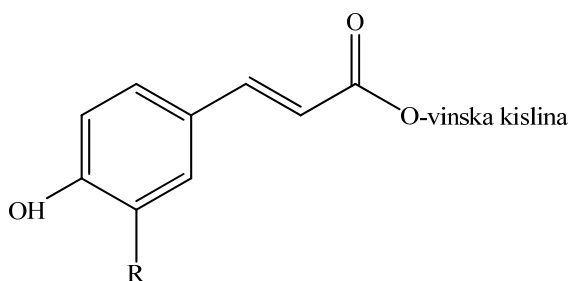
Slika 6: Strukturna formula flavonolov (6)

Ime flavonola	R ₁	R ₂
Kamferol	H	H
Kvercetin	OH	H
Miricetin	OH	OH

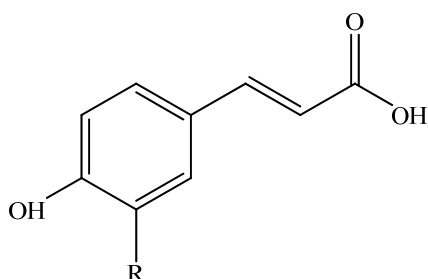
1.2.2 Neflavonoidi

◆ Derivati 4-hidroksicimetne kisline

Derivati 4-hidroksicimetne kisline so prevladujoči polifenoli v grozdnem soku in belem vinu. Najpogostejše kisline so kutarna, kaftarna in fertarna kislina (Slika 7). Te kisline se v grozdju večinoma nahajajo v obliki estrov z vinsko kislino, v vinu pa lahko pride do hidrolize in zato najdemo v vinu tudi proste oblike teh kislin. (5)



Ime 4-hidroksicimetne k.	R
kaftarna kislina	OH
kutarna kislina	H
fertarna kislina	OCH ₃

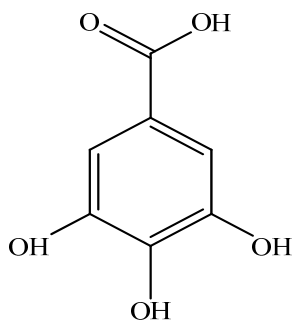


Ime 4-hidroksicimetne k.	R
kavna kislina	OH
<i>p</i> -kumarna kislina	H
ferulna kislina	OCH ₃

Slika 7: Strukturne formule 4-hidroksicimetnih kislin v vinu (6)

◆ Hidroksibenzojske kisline

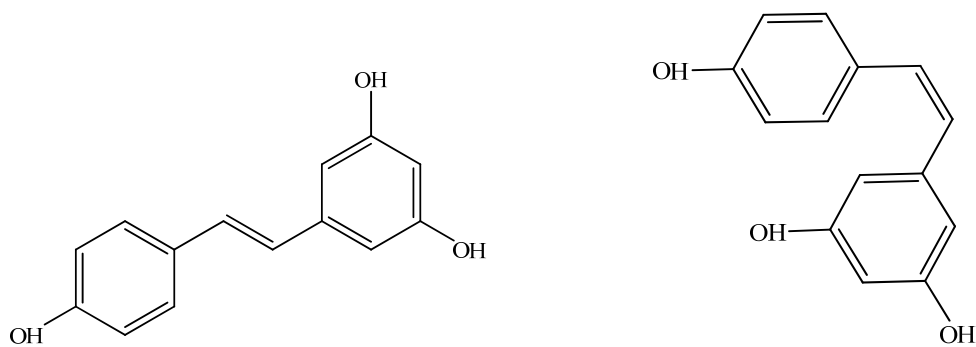
Najpomembnejše hidroksibenzojske kisline v rdečem vinu so galna, vanilijeva in siringinska kislina. Galna kislina, ki jo vidimo na Sliki 8, je zaradi treh prostih hidroksilnih skupin močan antioksidant.



Slika 8: Galna kislina (6)

◆ Stilbeni

Stilbeni predstavljajo najmanjši delež celokupnih polifenolov v vinu, saj so prisotni v nizkih koncentracijah, to je povprečno 7 mg/L v rdečih in 0,5 mg/L v belih vinih. Glavni predstavnik skupine je resveratrol, ki nastane v jagodni kožici med procesom obrambe vinske trte proti glivam. V grozdju sta prisotna *trans*- izomer in njegov glukozid, v vinu pa pod vplivom s svetlobo katalizirane izomerizacije nastaneta še *cis*- oblika in njen glukozid. Resveratrol (Slika 9) ima močno antioksidativno delovanje, sama biorazpoložljivost pa je majhna. Zaradi svojih varovalnih učinkov je v zadnjem desetletju postal predmet mnogih raziskav, ki proučujejo terapevtski potencial resveratrola pri kardiovaskularnih in rakavih obolenjih. (6) Zavedati pa se moramo, da so v in-vitro študijah večinoma testirani polifenoli, ki so prisotni v vinu, zelo verjetno pa je, da mnogokrat aktivne komponente niso le polifenolne spojine iz vina, temveč njihovi pogosto neznani metaboliti. Obenem pa so poskusi težavni že zaradi samega števila prisotnih spojin v vinu, saj pride v kompleksni mešanici, kot je vino, do sinergističnega učinka spojin.



Slika 9: Strukturni formuli izomerov resveratrola (*trans* na sliki levo in *cis* na sliki desno) (6)

◆ Tanini

Tanini so polimerne molekule fenolnih spojin z molekulsko maso med 600 in 3500 g/mol (9), ki se lahko vežejo s proteini ali polisaharidi. V rdečih vinih imajo vpliv na okus in barvo vina, hkrati pa so odlični antioksidanti in naravni konzervansi. Razlikujemo hidrolizirajoče in kondenzirane tanine.

Hidrolizirajoči tanini so estri galne ali elagne kisline z glukozo in drugimi sladkorji. Glede na prisotno kislino jih podrobneje razdelimo na galotanine in elagotanine. V vino se ekstrahirajo iz hrastovih sodov in lahko hidrolizirajo, pri čemer se elagna kislina obori, galna kislina pa je v vinu topna. Celokupna prosta galna kislina v vinu je seštevek galne kisline iz hidrolizirajočih in kondenziranih taninov.

Kondenzirani tanini so polimeri flavan-3-olov, najpogosteje epikatehina in katehina. S staranjem vina vrednost kondenziranih taninov v vinu upada, saj se polimeri večajo vse dokler niso več topni in se oborijo. (6)

1.2.3 Polifenoli in srčno-žilna obolenja

Francozi so prvi pripisali zmanjšano pojavnost srčno-žilnih bolezni (koronarna srčna bolezen, miokardni infarkt, ateroskleroza) zmernemu uživanju rdečega vina in leta 1992 ugotovitve predstavili pod izrazom francoski paradoks. Mnoge epidemiološke študije dandanes potrjujejo

varovalne učinke s polifenoli bogate prehrane, obenem pa znanstveniki raziskujejo še ne povsem pojasnjene mehanizme delovanja polifenolnih spojin *in vitro* in na živalskih modelih. Polifenolne spojine iz rdečega vina imajo celo paleto bioloških učinkov. Poznan je močan antioksidativni učinek, kjer polifenoli reagirajo z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi, preprečujejo njihov nastanek, hkrati pa kelirajo kovinske ione. Vse to se odrazi kot zmanjšanje oksidacije LDL. Polifenoli se vpletajo v metabolizem arahidonske kisline in posledično inhibirajo agregacijo trombocitov ter zavirajo sintezo protrombotičnih in provnetnih mediatorjev. Dokazano je povečanje tvorbe in biološke aktivnosti NO, ki ima močan vazodilatatorni učinek, rdeče vino pa vpliva tudi na druge prenašalce, ki uravnavajo žilni tonus. Vse naštetu govori v prid kardioprotektivni vlogi rdečega vina in nakazuje na verjetno uporabo teh spojin v prihodosti. Preden bodo spojine dočakale faze kliničnega testiranja pa moramo še natančneje opredeliti nekatere mehanizme delovanja, pojasniti poti absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije teh spojin in izključiti možne stranske učinke. (10)

1.3 Mehanizem krčenja in sprostitve gladkih mišičnih celic

Krčenje in sproščanje žil je neposredno odvisno od delovanja gladkih mišičnih celic žil (Slika 10). Na le-te lahko vplivajo snovi, ki se sproščajo iz simpatičnih živčnih končičev (noradrenalin), hormoni v krvnem obtoku (npr. vazopresin, angiotenzin 2 in adrenalin), ter mnoge vazokonstriktorne (endotelini, angiotenzin 2 in drugi) in vazodilatatorne snovi (NO, prostaglandini in drugi), ki jih izloča endotelij, ter seveda snovi, ki pridejo v telo od zunaj, med njimi tudi polifenoli.

Skrčenje gladke mišične celice je lahko posledica povišanja znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov, lahko pa povečane občutljivosti znotrajceličnih struktur za kalcijeve ione.

Ligandi zvišajo znotrajcelično koncentracijo kalcija po različnih poteh:

1. preko receptorjev, ki so sklopljeni z G-proteini, ki aktivirajo fosfolipazo C
2. preko napetostno odvisnih kalcijevih kanalov, ki se odprejo ob depolarizaciji celice (npr. s KCl)
3. preko receptorsko aktiviranih kalcijevih kanalov.

Zniževanje $[Ca^{2+}]_i$ poteka preko:

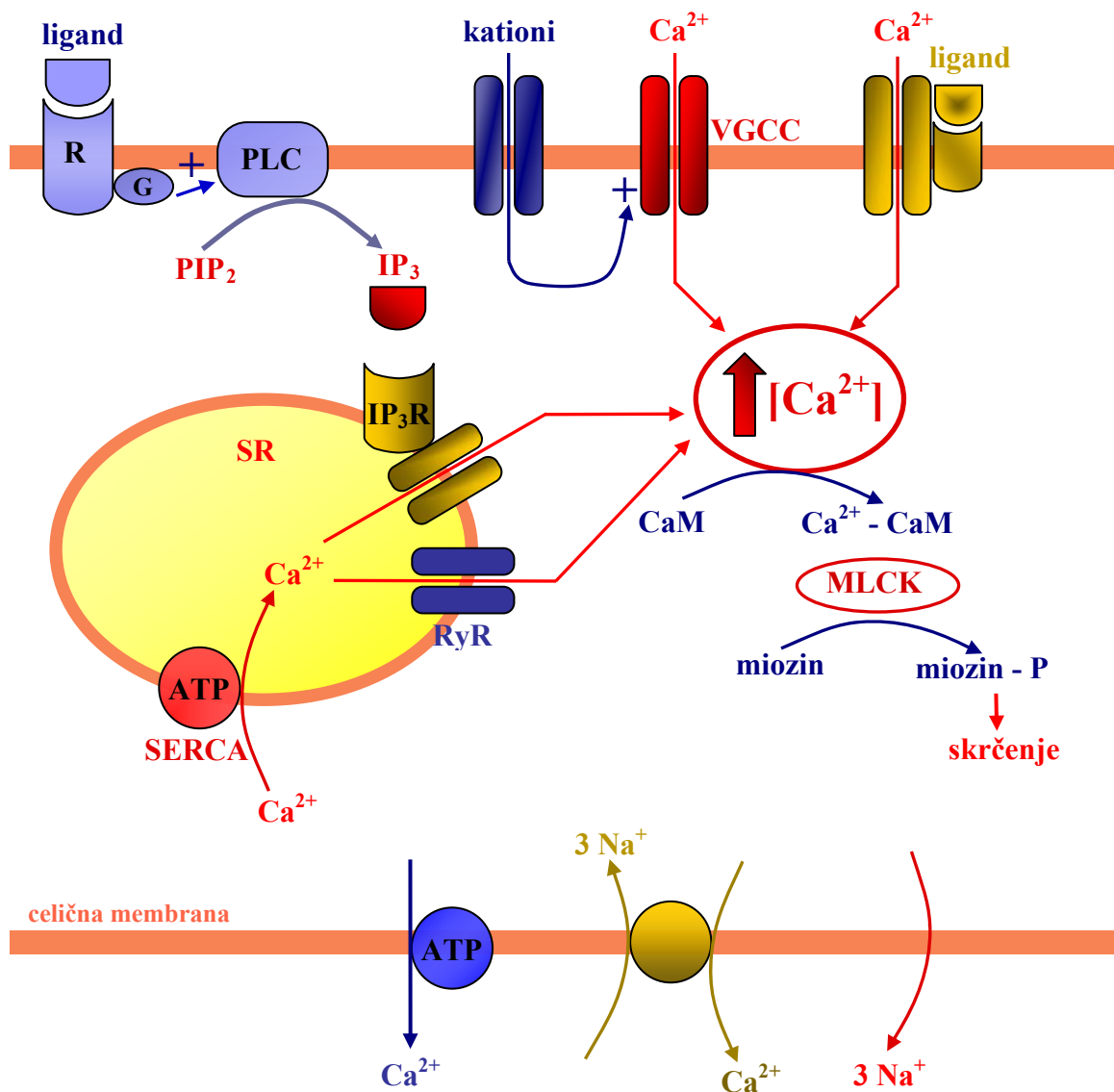
1. sarkoplazmatski retikulum - Ca^{2+} -ATPaza, ki črpa v notranjost SR

2. plazmalemske Ca^{2+} -ATPaze

3. $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjevalca.

Kalcijevi ioni s kalmodulinom tvorijo kompleks, ki aktivira kinazo lahke verige miozina. Kompleks nato fosforilira lahko verigo miozina, fosforilacija pa je ključna, saj omogoči interakcijo miozina z aktinom znotraj gladke mišične celice. To privede do cikličnega nastajanja in prekinjanja prečnih aktinsko-miozinskih mostičkov in s tem tonične skrčitve gladke mišice. (11,12) Proces poteka, dokler se lahke verige miozina fosforilirajo, kar je odvisno od koncentracije Ca^{2+} in ATP.

Ko se lahke verige miozina defosforilirajo, se gladka mišična celica sprosti. Reakcijo defosforilacije miozina pospešuje encim miozinska fosfataza, ki je v celici ves čas prisotna in aktivna. Sprostitev gladke mišične celice je tako odvisna samo od zmanjšanja aktivnosti kinaze lahke verige miozina. (13)



Slika 10: Shematski prikaz krčenja gladke mišične celice in uravnavanja znotrajcelične koncentracije kalcija. Skrčenje je posledica povišanja znotrajcelične koncentracije kalcija.

Okrajšave pomenijo: R – receptor, G – G-proteini, PLC – fosfolipaza C, PIP_2 – fosfatidilinozitol-4,5-difosfat, IP_3 – inozitol-1,4,5-trifosfat, IP_3R – receptor za vezavo IP_3 , MLCK – kinaza lahke verige miozina, Ca^{2+} -CaM – kompleks kalcija in kalmodulina, RyR – rianodinski receptor, SERCA – sarkoplazmatski retikulum- Ca^{2+} -ATPaza, VGCC – napetostno odvisni kalcijevi kanali, MLCK – kinaza lahke verige miozina, SR – sarkoplazmatski retikulum, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – znotrajcelična koncentracija kalcijevih ionov, ATP – adenin trifosfat, miozin-P – fosforiliran miozin.

1.4 Zgradba in delovanje G-proteinov

Mehanizme za prenos signala na celični ravni razdelimo v dve glavni skupini. Prva skupina za prenos signalov uporablja znotracelične receptorje, druga skupina mehanizmov pa deluje preko receptorjev na površini celice. Receptorje druge skupine razdelimo na tri vrste:

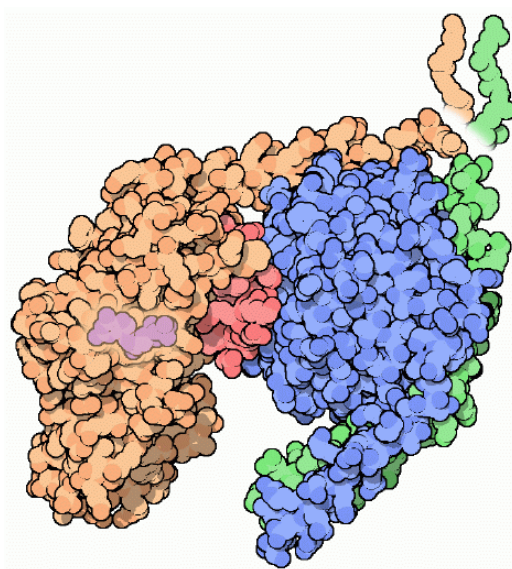
1. receptorji, ki so hkrati ionski kanali,
2. receptorji, ki imajo lastno znotrajcelično encimsko aktivnost (običajno kinaze) in
3. receptorji, ki so sklopljeni z G-proteini. (14)

G-proteini so tako pogosto vključeni v medcelične signalne poti in delujejo kot pomembna molekularna stikala, sodelujejo pa tudi pri mnogih drugih celičnih procesih, kot so na primer transport veziklov, sestavljanje citoskeleta, celična rast in sinteza proteinov. (15) Izmed več kot 350 poznanih različnih kompleksov G-protein-receptor jih za približno 150 še ne vemo točne funkcije. Poznano pa je, da so vključeni v mehanizem krčenja in sproščanja gladkih mišic, med drugim tudi v žilni steni, kar se vidi tudi na Sliki 10.

Delimo jih na dve veliki družini: heterotrimerni G-proteini (Slika 11), ki so pomembni pri prenosu signalov od sedemtransmembranskih receptorjev do efektivskih molekul (16) in monomerni G-proteini, ki sodelujejo pri uravnavanju zelo različnih celičnih procesov. (17) Pri naši raziskavi smo se ukvarjali izključno s heterotrimernimi G-proteini, zato bomo le-te obravnavali prednostno in obsežneje.

1.4.1 Heterotrimerni G-proteini

So heterotrimeri, saj so sestavljeni iz treh podenot: α , β , γ , molekulska masa podenot pada v danem zaporedju. α -podenota je odgovorna za vezavo in hidrolizo GTP, β in γ - podenoti tvorita nekovalentno vezan dimer, ki se funkcionalno obnaša kot ena podenota. Lipidna sidra (na α in γ -podenoti) povezujejo G-protein z membrano. (18)



Slika 11: Struktura heterotrimernega G-proteina (α -podenota je oranžne barve, β -podenota modre in γ -podenota zelene barve; na α -podenoti vidimo molekulo GDP v vijolični barvi in rdeče obarvano področje, ki je pomembno za ločitev α in β - γ podenot pri aktivaciji G-proteinov. V zgornjem desnem delu strukture sta vidni dve lipidni sidri.) (19)

Podenota α je velika med 39-52 kDa in je sestavljena iz dveh domen. GTPazno domeno tvori 6 β -struktur, ki jih obkroža 6 α -vijačnic, na njej pa se nahajajo vezavni žep za GDP, vezavni mesti za receptor ter efektor in vezavno mesto za kompleks $\beta\gamma$. Vijačna domena pa je sestavljena iz centralne α -vijačnice, obdane s 5 krajšimi vijačnicami. Funkcija vijačne domene ni poznana (20), vendar podenota α ob odstranitvi le-te ne deluje več. V celicah sesalcev prepoznamo do 23 različnih podenot α (21), izražanje različnih podenot pa se razlikuje glede na tkiva. V somatskih celicah se lahko istočasno izrazi tudi do 10 različnih podenot, pri senzoričnih (vid, voh, okus) in hematopoetskih pa prevladuje samo določena vrsta.

Heterotrimerne G-proteine razvrstimo v 4 poddružine glede na strukturne (glede na homolognost sekvenc) in funkcionalne lastnosti podenote α . To so $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$, katerih lastnosti so podrobneje predstavljene v preglednici. (19)

Tabela 2: 4 poddružine heterotrimernih G-proteinov in njihove lastnosti.

DRUŽINA G- PROTEINOV	VRSTA PODENOTE α	GEN	VRSTA EFEKTORSKEGA PROTEINA	VRSTA RECEPTORJA	UČINEK
G_i					
$G_{i/o}$	α_i , α_o	GNAO1, GNAI1, GNAI2, GNAI3	inhibicija AC, odprtje K^+ - kanalov, zaprtje Ca^{2+} - kanalov	M_2 in M_4 , kemokinski, α_2 - adrenergični, 5- HT ₁ , H ₃ in H ₄ , D ₂	skrčenje gladke mišice, depresija živčevja
G_t	α_t	GNAT1, GNAT2	Aktivacija fosfodiesteraze 6	Rodopsin	Vid
G_{gust}	α_{gust}	GNAT3	Aktivacija fosfodiesteraze 6	rec. za okušanje	okus

G_z	α_z	GNAZ	inhibicija AC	ni poznano	vzdrževanje ionskega ravnotežja perilimfatičnih in endolimfatičnih tekočin polža v ušesu
G_s					
G_s	α_s	GNAS	aktivacija AC	β -adrenoreceptorji, 5-HT ₄ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇ , D ₁ , H ₂	povečan utrip srca, sprostitvev gladkih mišic in stimulacija živčevja
G_{olf}	α_{olf}	GNAL	aktivacija AC	vohalni receptorji	Vonj
G_q					
G_q	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	GNAQ, GNA11, GNA14, GNA15	aktivacija fosfolipaze C	$\alpha_1, H_1, 5-HT_2, M_1, M_3, \text{ in } M_5$	kontrakcija gladkih mišic, vpliv na Ca ²⁺ - kanale
$G_{12/13}$					
$G_{12/13}$	α_{12}, α_{13}	GNA12, GNA13	aktivacija Rho-družine GTPaz		nadzor funkcij citoskeleta, kontrakcija gladkih mišic

Funkcija heterotrimernih G-proteinov je prenos informacije od receptorja do določenega efektorskega proteina (npr. fosfolipaze, adenilatne ciklaze, ionski kanali in diesteraze). Ob aktivaciji se aktivnost efektorskih proteinov spremeni, to pa vodi do sprememb v celičnem delovanju, ki so lahko takojšnje in trajajo kratek čas – primer sta sekrecija različnih snovi iz

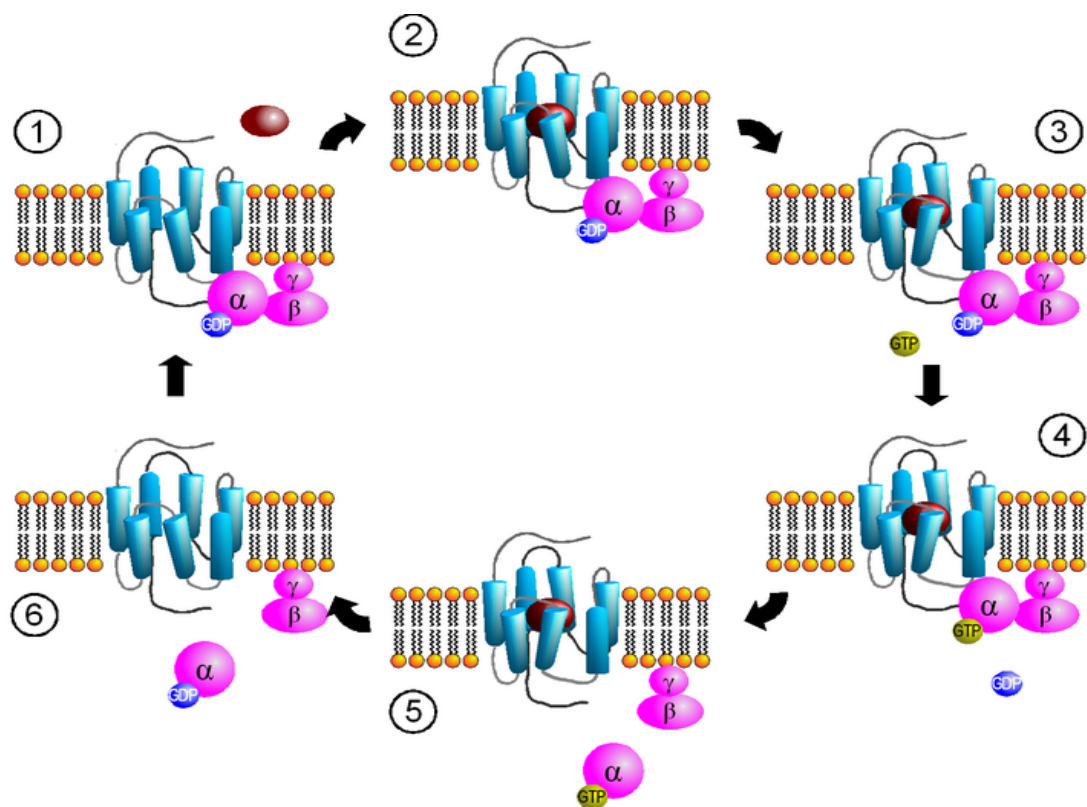
celic in krčenje mišic. Lahko pa se učinki pokažejo z zamikom in trajajo dalj časa, na primer spremembe izražanja genov, ki vodijo v rast in diferenciacijo celic. (22)

1.4.2 Monomerni G-proteini

Monomerni G-proteini so veliki od 20-25 kDa, imenujemo pa jih tudi majhne GTPaze. Strukturno so zelo podobni GTPazni domeni α -podenote heterotrimerov. Glede na razlike v delovanju jih razvrščamo v 5 poddružin (Ras, Arf, Rab, Rac/Rho in Ran). Najbolj raziskana je poddružina Ras, ki ima zelo raznoliko delovanje, saj v odgovor na zunajcelične signale sodeluje pri procesih celične delitve, rasti, diferenciacije ter procesih apoptoze, hkrati pa usklajuje delovanje ostalih majhnih GTPaz.

1.4.3 Mehanizem delovanja heterotrimernih G-proteinov

G-proteini so na notranji strani celične membrane sklopljeni z receptorjem, ki prebada membrano in delujejo kot molekularno stikalo. Ko so povezani z GTP, so aktivirani, v mirujočem stanju pa so vezani na GDP. Ker vežejo GTP, hkrati pa pospešujejo njegovo razgradnjo do GDP in anorganskega fosfata, jih uvrščamo v obsežno družino encimov, ki jih imenujemo GTPaze. (23) Preklapljanje med bazalnim in aktiviranim stanjem opišemo ciklično (Slika 12), imenujemo pa GTPazni cikel G-proteinov. Cikel poteka tudi v bazalnem stanju, ko pa se na receptor veže endogeni ali eksogeni ligand, je posledica vezave zaviranje ali spodbujanje cikla.



Slika 12: GTP-azni cikel G-proteinov (23)

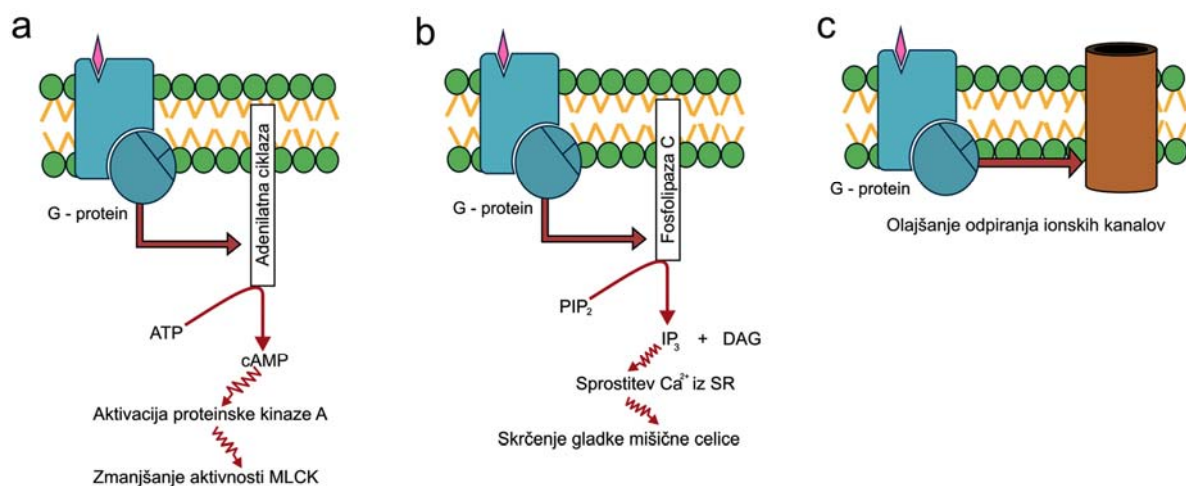
1. Bazalno stanje transmembranskega kompleksa G-protein-receptor. G-protein (vijolične barve) je heterotrimer, molekula GDP (temnomodre barve) je čvrsto vezana na α -podenoto.
2. Agonist (rjave barve) se veže na receptor (svetlomodre barve), ga konformacijsko spremeni in ga tako aktivira.
3. Aktivacija receptorja povzroči konformacijsko spremembo podenote α , to pa povzroči manjšo afiniteto podenote do GDP in njegov odcep.
4. Na prazno podenoto α se z visoko afiniteto zdaj veže GTP (zelene barve) in G-protein preide v aktivirano stanje.
5. Vezava GTP povzroči novo konformacijsko spremembo podenote α , ki omogoči disociacijo α -podenote z vezanim GTP od $\beta\gamma$ - podenote. Oba prosta dela G-proteina sta biološko aktivna in uravnavata delovanje mnogih efektorskih proteinov.
6. Aktivacija efektorskega proteina je začasna in se prekine zaradi GTPazne aktivnosti α -podenote. Po hidrolizi GTP ostane na α -podenoto vezan GDP, kar omogoči ponovno združitev podenot, po združitvi pa podenoti nista več aktivni. Neaktivni heterotrimer

se poveže z receptorjem in vzpostavi se izhodiščno stanje. Dokler je na receptor vezan agonist, se ta cikel ponavlja in se prekine šele po razvezavi receptorja in agonista. (povzeto po 14)

Vrsta efektorskega mehanizma zavisi od vrste podenote in tipa celice. Podenota α lahko stimulira ali inhibira adenilatno ciklazo (Slika 13a), ta pa katalizira sintezo cAMP iz ATP. cAMP aktivira proteinsko kinazo A (PKA), kar se odrazi kot fosforilacija funkcionalnih proteinov. Pomembna je fosforilacija kinaze lahke verige miozina (MLCK), s čimer se zmanjša aktivnost le-te.

Slika 13b prikazuje aktivacijo fosfolipaze C (PLC), ki katalizira razpad membranskega fosfolipida fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PIP_2) v inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3) in diacilglicerol (DAG). IP_3 se veže na kalcijev kanalček na sarkoplazmatskem retikulumu, ki se odpre, kar povzroči vdor kalcija v mioplazmo in s tem kontrakcijo gladke mišične celice. Po drugi strani pa DAG spodbuja proteinsko kinazo C, kar povzroči fosforilacijo določenih encimov.

Prav tako pa podenota α nekaterih G-proteinov uravnava odpiranje ionskih kanalov (Slika 13c).



Slika 13: Efektorski mehanizmi z G-proteini sklopljenih receptorjev. (24)

Okrajšave pomenijo: cAMP – ciklični adenozinmonofosfat, MLCK – kinaza lahke verige miozina, IP_3 – inozitol-1,4,5-trifosfat, PIP_2 – fosfatidilinozitol-4,5-difosfat, DAG – diacilglicerol, SR – sarkoplazmatski retikulum. (24)

Danes vemo, da dimer $\beta\gamma$ ne deluje le kot negativni regulator podenote α , ampak samostojno nadzoruje muskarinske kanale za K^+ (25,26), regulira fosfolipazo C, β -adrenergično receptorsko kinazo, adenilatno kinazo (25) in mnoge druge efektorske proteine.

Dejavnik, ki napoveduje čas delovanja obeh podenot oz. čas aktivacije G-proteina, je hitrost hidrolize GTP. $G\alpha$ -podenota G-proteinov je zelo slaba hidrolaza, zato je hidroliza GTP počasna. Tako je omogočeno delovanje $G\alpha$ -podenote na efektorsko molekulo, saj se nanjo veže le, ko GTP še ni hidroliziran. Poznamo tudi naravne regulatorne proteine, ki z vezavo na $G\alpha$ -podenoto pospešijo ali zavirajo GTP-azno aktivnost $G\alpha$ -podenote.

Fizioloških mehanizmov, ki bi opisovali delovanje ligandov na G-proteine direktno in ne preko receptorja, ne poznamo, vendar pa tako delujejo nekateri toksini (toksin kolere, toksin pertusisa in mastoparan). Možno bi bilo, da tako delujejo na G-proteine tudi snovi iz naših frakcij rdečega vina.

1.5 Delovanje snovi iz rdečega vina na G-proteine

Povišan arterijski tlak ali hipertenzija je pomemben dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze in drugih srčno-žilnih obolenj, pa vendar pri kar 95% hipertonikov ne najdemo vzroka zanj. Ponavadi se kot nevarne izkažejo posledice dolgoročnega povišanja arterijskega pritiska. Arterijski tlak uravnava zelo kompleksen regulacijski sistem, ki ga sestavlja vrsta po organih ločenih mehanizmov, hkrati pa ni nobene naravne meje med normo- in hipertoniki, zato so raziskave etiopatogeneze hipertenzije izredno težavne. Že dolgo pa je znano, da hipertenzija spočne hipertenzijo, sproti nastajajo nove okvare in sproti se aktivirajo novi patološki mehanizmi. (27)

G-proteini se pomembno vključujejo v mehanizme krčenja in širjenja ožilja, in sicer povzročijo stimulacija G-proteinov s podenoto α_s (poddružina G_s) sprostitvev gladkih mišičnih celic v žilni steni, hkrati pa pride do istega efekta z zaviranjem G-proteinov s podenotama α_i in α_o (poddružina G_i), z zaviranjem G-proteinov s podenotami α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} in α_{16} (poddružina G_q) in z zaviranjem G-proteinov s podenotama α_{12} in α_{13} (poddružina $G_{12/13}$). V našem diplomskem delu smo preizkusili vpliv vinskih frakcij na G-proteine s podenoto α_s (poddružina G_s) in G-proteine s podenoto α_i (poddružina G_i).

Oprli smo se na dve dejstvi. Prvo, da kot zdravilno smatramo le vsakodnevno pitje manjših količin rdečega vina in drugo, ki opredeljuje spremembe v celičnem delovanju ob aktivaciji G-proteinov, ki se lahko pojavijo takoj in so kratkotrajne ali pa se izrazijo z zamikom in trajajo dalj časa. Rdeče vino deluje na G-proteine po obeh poteh. Glede na prvi mehanizem predpostavljamo, da spojine iz vina z vsakodnevnim sproščanjem gladkih mišičnih celic v žilni steni zavirajo razvoj kronične hipertenzije preko zaviranja akutnih stanj povišanega arterijskega pritiska. Kot primer delovanja z zamikom pa navajamo spremembe genskega izražanja. Za rdeče vino je dokazano, da inducira transkripcijo endotelijske NO-sintaze (e-NOS) (28), na modulacijo genske ekspresije pa vplivajo tudi proantocianidini in antociani (29). Povezava med tonusom žil in aktivnostjo G-proteinov je tako na prvi pogled očitna, vendar doslej še ni bila nedvomno dokazana in natančno opredeljena.

2. NAMEN DELA

Številne študije že leta preučujejo dolgoročne posledice zmerne pitja rdečega vina na kardiovaskularni sistem. Kolegica Barbara Solar je leta 2009 v svojem diplomskem delu (30) proučevala vpliv frakcij biološko aktivnih snovi iz vina na izolirane žile podgane.

V našem diplomskem delu bomo poskušali ovrednotiti vpliv enakih frakcij rdečega vina na aktivnost G-proteinov, saj mislimo, da bodo nekatere izmed aktivnih spojin delovale sproščujoče na žilni tonus preko spremembe aktivnosti G-proteinov.

Naše delovne hipoteze so:

1. Frakcije rdečega vina Cabernet Sauvignon vsebujejo snovi, ki vplivajo na delovanje G-proteinov.
2. Različne vinske frakcije bodo na aktivnost G-proteinov delovale različno.
3. Z uporabo rekombinantnih G-proteinov vrste G_s in G_i nam bo uspelo pokazati, da vinske frakcije različno delujejo na posamezne vrste G-proteinov.
4. Morebitna aktivacija ali inhibicija rekombinantnih G-proteinov v membranah celic sf9 bi lahko nakazovala neposredno vezavo učinkovin iz vina na G-proteine.
5. Interpretacija dobljenih rezultatov in njihova korelacija s fiziološkimi učinki frakcij vina ne bo enostavna, dobili pa bomo vpogled, za katere frakcije in katere potencialne mehanizme delovanja bi bilo smiselno nadaljnje preučevanje.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Reagenti, aparature, pribor in oprema

Reagenti

Reagenti, uporabljeni pri pripravi frakcij vina:

Aceton (Fluka, Švica)

Argon (Messer, Slovenija)

1-Butanol (Riedel-de Haën, Nemčija)

Dietileter (Fluka, Švica)

Etilacetat (Fluka, Švica)

Petroleter (Riedel-de Haën, Nemčija)

Rdeče vino Cabernet Sauvignon, Goriška Brda, letnik 2004

Reagenti, uporabljeni pri gojenju celic sf9 in izražanju rekombinantnih G-proteinov:

Gojišče HyClone SFX-Insect (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

Penicilin-streptomycin raztopina (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

Foetal Bovine Serum (Gibco, ZDA)

Dimetilsulfoksid (DMSO) (Fluka, Švica)

Baculovirusi z vgrajenimi govejimi geni za G α s, G α i in G β 1 γ 2 (darilo prof. Hage, Tokio)

Reagenti, uporabljeni pri izolaciji korteksa iz podganjih možganov ter pripravi membran:

Pufer PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , NaCl – vse Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

Pufer TE (Tris-HCl, EDTA – vse Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

Reagenti, uporabljeni pri pripravi membranskega preparata iz celic sf9:

TE-pufer (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

Bradfordov reagent (Sigma, ZDA)

Albumin (Sigma, ZDA)

Reagenti, uporabljeni pri poskusih določanja vezave [^{35}S]GTP γ S na G-proteine:

TE-pufer (Tris, HCl, EDTA – vse Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

NaCl (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

GDP (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

DTT (Sigma-Aldrich Chemie, Nemčija)

Izotop [^{35}S]GTP γ S (Amersham Pharmacia Biotech, Velika Britanija)

Aparature, pribor in oprema

Aparature, pribor in oprema, uporabljeni pri pripravi vzorcev vina:

Analizna tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Sohn GmbH, Nemčija)

Buchi Rotavapor R-200 (Büchi, Švica)

Čaše: 100mL, 500mL

Merilni valji: 100mL, 250 mL

Stojalo

Prižemki

Lij ločnik, 2L

Erlenmajerice 1L

Bučke 100mL, 2L

Hladilnik (Gorenje, Slovenija)

Zamrzovalnik (Gorenje, Slovenija)

Aparature, pribor in oprema, uporabljeni pri pripravi celic sf9:

Celice sf9 (Gibco, ZDA)

Inkubator I-CO2-150H (Kambič: laboratorijska oprema, Slovenija)

Mikroskop Telaval 31 (Zeiss, Nemčija)

Centrifuga Megafuge 1.0 (Heraeus, Velika Britanija)

Petrijevke velikosti 25cm² in 60,1cm² (TPP, Švica)

Centrifugirke (TPP, Švica)

Avtomatska pipeta Accu Jet (Brand, Nemčija)

Pipete za enkratno uporabo: 1mL, 5mL, 10mL, 25mL (TPP, Švica)

Hladilnik (Gorenje, Slovenija)

Aparature, pribor in oprema, uporabljeni pri pripravi membranskih preparatov iz korteksa podganjih možganov:

Homogenizator Polytron (Braun AG, Nemčija)

Ultracentrifuga Beckman J2-MC, (Beckman Instruments, ZDA)

Rotor SA-20J (Beckman Instruments, ZDA)

Spektrofotometer DU 7500 (Beckman Instruments, Nemčija)

Aparature, pribor in oprema, uporabljeni pri pripravi membranskih preparatov iz celic sf9:

Homogenizator (Braun AG, Nemčija)

Ultracentrifuga Beckman J2-MC (Beckman Instruments, Nemčija)

Rotor SA-20J (Beckman Instruments, ZDA)

Spektrofotometer DU 7500 (Beckman Instruments, Nemčija)

Aparature, pribor in oprema, uporabljeni pri poskusih določanja vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine:

Filtri Sigma Millipore F/FG, tip 1 (Sigma, ZDA)

Scintilacijska tekočina Emulsier-Safe (Packard, ZDA)

Scintilacijski števec LKB 1214 Rackbeta (LKB, Švedska)

Aparatura za vakuumsko filtracijo (Sigma, ZDA)

3.2 Priprava frakcij vina Cabernet Sauvignon (Goriška Brda)

Najprej smo 1500 mL vina odparili pri znižanem tlaku in temperaturi 45°C do 900 mL. Rotavapirali smo trikrat po 500mL v dvolitrski bučki. Vrednost tlaka je bila odvisna od narave topila. Nato smo izvajali zaporedno ekstrakcijo v liju ločniku, in sicer z dvakrat po 400mL izbranega topila (petroleter, eter, etilacetat, 1-butanol). Tako smo dobili pet frakcij (petroletrna, etrna, etilacetatna, butanolna in vodna), ki smo jih do suhega uparili. Iz razlike med prazno in polno bučko smo izračunali maso suhe frakcije. Preden smo frakcije shranili, smo jih vedno prepihali z argonom.

Pred poskusi na G-proteinih smo 1% suhega preostanka posamezne frakcije raztopili v 3 mL vode, kar pomeni, da so nehlapne substance v tako dobljenih osnovnih raztopinah posameznih frakcij v petkrat večji koncentraciji kot v vinu. Pri petroletrni frakciji smo zaradi majhne mase, ki se v ekstrahiru s tem topilom, zatehtali 10% suhega preostanka po prvi ekstrakciji in ga raztopili v 3mL vode, tako da so v le tej osnovni frakciji spojine v 50-krat večji koncentraciji kot v vinu.

3.3 Priprava membran iz možganske skorje podgan

Vir možganov so bile glave samcev podgan seva Wistar, katerih druge organe so uporabili na Inštitutu za farmakologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Laboratorij je pridobil dovoljenje za poskuse na živalih pri Veterinarski upravi Republike Slovenije (št. 323-02-234/2 dne 18.5.2005).

Možgane smo izolirali, jih prenesli na ohlajen podstavek in jim odstranili prednji reženj. Preostanek smo prečno narezali na tanke rezine, ločili korteks, ga oprali v pufru PBS (11,2 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 95,8 mM Na₂HPO₄, 85 mM NaCl: pH 7,5), zamrznili v tekočem dušiku za čas transporta na Inštitut za biokemijo Medicinske fakultete, kjer smo takoj pripravili membrane. Izolacijo plazemskih membran smo izvedli po protokolu McKenzie-ja (31) z manjšimi spremembami (32). Najprej smo zamrznjen korteks odtalili v pufru PBS, ga osušili, dodali 5-kratni volumen pufra TE (10,0 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA: pH 7,5) in homogenizirali v homogenizerju Polytron. Teflonski bat smo vrteli pri 1000 RPM s 30 pasažami. Dobljen homogenat smo centrifugirali 15min pri 5000 X g. Oborino smo zavrgli, supernatant pa 60min centrifugirali v ultracentrifugi Beckman J2-MC, rotor A-20J. Membrane v oborini smo oprali tako, da smo jih resuspendirali v 10-kratnem volumnu pufra TE in ponovno centrifugirali 60min pri 40 000 X g. Po končanem centrifugiranju smo membrane v oborini resuspendirali v minimalni količini ledenomrzlega pufra TE in izmerili koncentracijo proteinov po Lowry-ju.(33) Raztopino plazemskih membran smo razredčili do končne koncentracije 2mg proteina/mL, jih razdelili na 100 µL deleže in jih zamrznili na -70°C. Vse izolacijske postopke smo izvajali na ledu. Tako pripravljene membrane smo pred izvajanjem poskusov testirali s pomočjo merjenja začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v prisotnosti in odsotnosti dveh peptidov, mastoparana ter galnona, katerih učinek na G-proteine je poznan.

3.4 Protokol za gojenje celic sf9

Vialo z zamrznjenimi celicami smo vzeli iz Dewarjeve posode in odtalili v 1 minuti. Vsebino smo takoj prenesli v ustrezno pripravljeno gojišče in dali v inkubator na 27°C in 5% CO₂. Po 30 min, ko so se celice prilepile na petrijevko, smo menjali gojišče, da smo odstranili čimveč strupenega dimetilsulfoksida (DMSO), ki smo ga dodali pri zamrzovanju kot krioprezervativno sredstvo. Celice smo gojili v sterilnih pogojih v inkubatorju na 27°C in 5% atmosferi CO₂. Rast celic smo kontrolirali pod mikroskopom in vsake 2-3 dni zamenjali gojišče, dokler celice niso bile konfluentne. To pomeni, da so celice enakomerno prekrile dno petrijevke in so se njihove membrane stikale, niso se pa še začele nalagati v več plasti. Ko smo uporabljali 60,1 cm² velike petrijevke, je bil končni volumen gojišča 10-12 mL, pri 147,8 cm² velikih petrijevkah pa je le-ta znašal 24-30mL. Paziti smo morali, da smo celice razporedili čimbolj enakomerno po petrijevki, zato smo po dodatku celic v gojišče previdno

premikali petrijevko. Precepljali smo vedno le konfluentne celice in jih pri tem redčili z gojiščem v razmerju 1:5. Celice, ki bi jih večkrat precepili pred konfluentno rastjo ali po njej, bi postale nezdrave.

Tabela 3: Prikaz povprečnega števila celic v odvisnosti od velikosti petrijevke.

Velikost petrijevke	Število celic sf9
60,1 cm ²	1,2 x 10 ⁷
147,8 cm ²	3 x 10 ⁷

3.5 Izražanje rekombinantnih G-proteinov

Princip ekspresije rekombinantnih G-proteinov temelji na tehnologiji BEVS (The Baculovirus Expression Vector System) in poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji kloniramo gensko informacijo s pomočjo vektorjev baculovirusa, kar imenujemo pomnoževanje rekombinantnih virusov, nato pa izrazimo želeni protein v celicah insekta. V našem primeru so to celice sf9, ki so izolirane iz ovarijskega tkiva metulja *Spodoptera frugiperda*, in sicer na razvojni stopnji ličinke. (34)

Najprej smo namnožili bakuloviruse (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus - AcNPV). Za to smo potrebovali ustrezno količino zdravih celic sf9, ki smo jih precepili v 150 cm² petrijevke. V vsako petrijevko smo dodali 80 µL originalnih rekombinantnih virusov Gα_x ali Gβ₁γ₂. Počakali smo, da so vse celice lizirale, kar je trajalo približno 10 dni. Nato smo gojišče s sproščenimi virusi centrifugirali 20 min pri 1000 RPM in supernatant prenesli v svežo centrifugirko. Ovili smo s folijo, označili in shranili v hladilniku do okužbe.

Za izražanje rekombinantnih G-proteinov smo potrebovali dovolj konfluentnih petrijev, da smo precepili celice v 20 velikih petrijev tako, da je bila pokrita približno polovica površine. 15 petrijev smo okužili, 5 jih je služilo za kontrolo. Ko so se celice pritrdile, smo v 15 petrijev dodali viruse, 6 mL raztopine ustreznega G_x in 4 mL raztopine G_βγ v vsako petrijevko. Viruse smo vzeli iz hladilnika uro pred okužbo, da je bila njihova temperatura čim bližje sobni. Po okužbi smo počakali 1 uro, da so virusi vstopili v celice in jih okužili, nato

smo zamenjali gojišče in pustili delovati viruse v celicah 3 dni. Po treh dneh smo pregledali petrijevke pod mikroskopom in pripravili membranski preparat.

Priprava membranskega preparata je potekala tako, da smo celice postrgali in jih centrifugirali v gojišču 5 min pri 1500 RPM. Odstranili smo supernatant, dodali malo ledeno mrzlega pufra TE in združili vse celice z rekombinantnim proteinom in vse kontrole, vsake posebej. Od tukaj dalje so vsi nadaljni postopki potekali na ledu. Celice smo najprej homogenizirali na polavtomatskem homogenizatorju, in sicer 30 pasaž pri 1000 RPM. Nato smo prenesli homogenat v ohlajene centrifugirke, ki smo jih vstavili v ohlajen rotor in centrifugirali 20 min pri 5.700 RPM. S tem smo odstranili ostanke celic. Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in ponovno centrifugirali 1 h pri 18.500 RPM. Obdržali smo oborino in jo raztopili v približno 2 mL pufra TE. Membrane smo še enkrat homogenizirali s pomočjo ročnega homogenizatorja, da smo dobili bolj enotno suspenzijo. Po določitvi koncentracije, smo membrane razredčili na 2-4 mg proteina/mL, alikvotirali v eppendorfove epruvete in jih postopoma zamrznili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, kjer jih lahko hranimo več let. (35) Na enak način smo pripravili tudi membrane iz neinficiranih sf9 celic, ki so nam služile za testiranje uspešnosti izražanja rekombinantnih G-proteinov.

Test uspešnosti izražanja rekombinantnih G-proteinov v celični liniji sf9 smo naredili tako, da smo izmerili začetno hitrost vezave [^{35}S]GTP γ S na G-proteine v membranah iz neinficiranih celic sf9 ter jo primerjali z začetno hitrost vezave [^{35}S]GTP γ S na G-proteine v membranah z bakulovirusi inficiranih sf9-celic, ki so vsebovali genski zapis za ustrezne G-proteine.

3.6 Določanje hitrosti vezave [^{35}S]GTP γ S na G-proteine

Da bi ugotovili, kako vinski ekstrakti vplivajo na aktivnost G-proteinov, smo določali začetno hitrost vezave [^{35}S]GTP γ S na G-proteine v izoliranih membranah celic sf9 v odsotnosti in prisotnosti ekstrakta. [^{35}S]GTP γ S je radioaktivni analog GTP, ki je kemijsko gvanozin 5'-O-[γ -tio]trifosfat, ki ne hidrolizira in se praktično ireverzibilno veže na podenoto α heterotrimernih G-proteinov. Začetna hitrost vezave [^{35}S]GTP γ S na G-proteine odraža stanje, v katerem se G-protein nahaja – ko so aktivirani, je večja, ko so inhibirani, pa manjša od bazalne vrednosti. Začetno hitrost vezave smo določali radiometrično po protokolu McKenzie-ja (36), ki smo ga rahlo modificirali (37).

Reakcijski zmesi, ki je vsebovala 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM ditionitroreitol (DTT) in 1 μM GDP, smo dodali določeno količino preiskovanega ekstrakta in dopolnili s pufrom TE do 75 μL. Pod posebnimi pogoji smo dodali 5 μL [³⁵S]GTPγS z aktivnostjo približno 70.000 cpm. Po dodatku 20 μL membran z G-proteini, smo vzorce 2 min inkubirali na vodni kopeli pri 22°C, nato pa prekinili vezavo z dodatkom 900 μL ledenomrzlega pufru TE. Nevezan [³⁵S]GTPγS smo ločili od vezanega s hitrim filtriranjem skozi filtre premera 1,6 mikrom pod vakuumom in nadaljnjim spiranjem z 2-krat po 5ml ledenomrzlega pufru TE. Radioaktivne snovi na filterih smo ekstrahirali iz filtra v scintilacijski tekočini Emulsier-Safe preko noči in izmerili radioaktivnost s scintilacijskim števcem LKB 1214 Rackbeta.

3.7 Obdelava podatkov

Priprava grafov:

Grafe smo narisali s programom Prism4 (Graphpad, ZDA). Vsako točko v grafih smo podajali kot srednjo vrednost s pripadajočo standardno deviacijo, kar program izračuna s pomočjo vgrajenega algoritma. Premice in krivulje doznih odvisnosti smo izračunali z istim programom, ki po metodi najmanjših kvadratov s pomočjo linearne (za premice) in nelinearne (za krivulje) regresije prilagodi parametre ustreznih enačb tako, da se izračunane premice oz. krivulje najboljše prilegajo eksperimentalnim točkam. Enačbi za premico in enofazno dozno odvisnost sta del programa, enačbo za dvofazno dozno odvisnost (vsota dveh enofaznih doznih odvisnosti) pa smo v program vnesli sami. Prikazali smo le tiste krivulje, pri katerih so vrednosti parametrov med računalniškim prilagajanjem teoretičnih krivulj eksperimentalnim podatkom ustrezno konvergirale, s čemer je zagotovljena statična ustreznost dobljenih krivulj.

4. REZULTATI

4.1 Izolacija frakcij vina

Vino smo dealkoholizirali in ekstrahirali z različnimi topili. Po prvi ekstrakciji smo dobili dovolj velike mase vseh frakcij razen petroleterne, zato smo ekstrakcijo s petroletrom ponovili večkrat. Količina posameznih pridobljenih frakcij je prikazana v Tabeli 4.

Tabela 4: Suhe mase frakcij pridobljenih iz 1500 mL vina Cabernet Sauvignon.

VRSTA FRAKCIJE	MASA FRAKCIJE PO POSAMEZNI EKSTRAKCIJI [g]		
	1.	2.	3.
petroletrna frakcija	0,0354	0,0261	0,1328
dietiletrna frakcija	1,1669	-	-
etilacetatna frakcija	1,3536	-	-
butanolna frakcija	9,7862	-	-
vodna frakcija	31,28	-	-

4.2 Redčenje frakcij vina

Pred poskusi na G-proteinih smo 1% suhega preostanka posamezne frakcije raztopili v 3 mL vode, kar pomeni, da so nehlapne substance v tako dobljenih osnovnih raztopinah posameznih frakcij v petkrat večji koncentraciji kot v vinu. Pri petroletrni frakciji smo zaradi majhne mase, ki se v ekstrahira s tem topilom, zatehtali 10% suhega preostanka po prvi ekstrakciji in ga raztopili v 3mL vode, tako da so v le tej osnovni frakciji spojine v 50-krat večji koncentraciji kot v vinu. Osnovne frakcije smo označili z 1. Vsaka naslednja varianta posameznih frakcij (2, 3 in 4) je stokrat bolj razredčena predhodna frakcija.

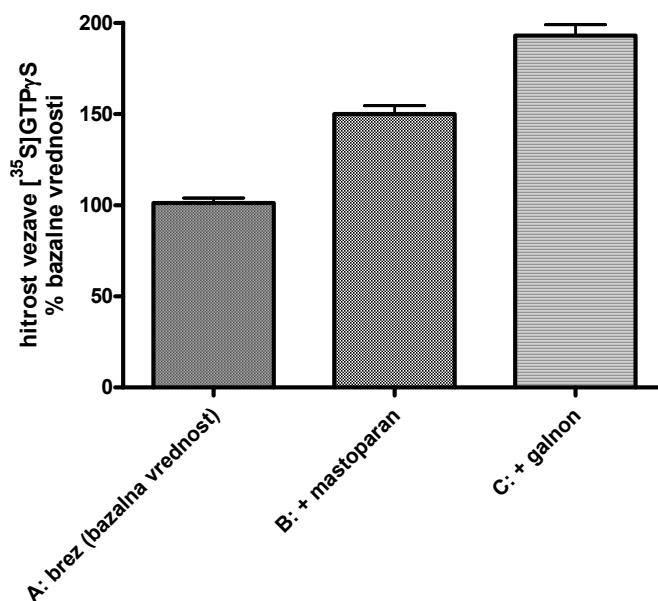
Tabela 5: Koncentracije in razredčitve preizkušenih raztopin posameznih vinskih ekstraktov.

	Razredčitev.	PE	DEE	EtAc	BuOH	vodna
	Matična raztopina.	1,17 mg/ml	5,27 mg/mL	5,93 mg/mL	35,4 mg/mL	128,8 mg/mL
Faktor razredčitve matične raztopine in številka vzorca.	Volumen vzorca dodanega v testno zmes ($\mu\text{L}/100\mu\text{L}$).	Koncentracija v 100 μL testne zmesi (mg /mL).				
1 \rightarrow (1)	25 (1)	$2,9 \times 10^{-1}$	1,3	1,5	8,9	32,2
	2,5 (1)	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$8,9 \times 10^{-1}$	3,2
$10^2 \rightarrow$ (2)	25 (2)	$2,9 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$8,9 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-1}$
	2,5 (2)	$2,9 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-2}$
$10^4 \rightarrow$ (3)	25 (3)	$2,9 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-3}$
	2,5 (3)	$2,9 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$8,9 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-4}$
$10^6 \rightarrow$ (4)	25 (4)	$2,9 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$8,9 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-5}$
	2,5 (4)	$2,9 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$8,9 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-6}$

4.3 Test ustreznosti membran

Membrane iz korteksov podganjih možganov

Membrane, ki smo jih pripravili, sta z določitvijo začetne hitrosti vezave [^{35}S]GTP γS na G-proteine v teh membranah ob prisotnosti in odsotnosti mastoparana in galnona testirala Katja Štern in Lovro Vidmar, študenta Medicinske fakultete, ko sta jih uporabila za delo pri svoji nalogi za Prešernovo nagrado (22). Njune rezultate povzemamo v Sliki 14.

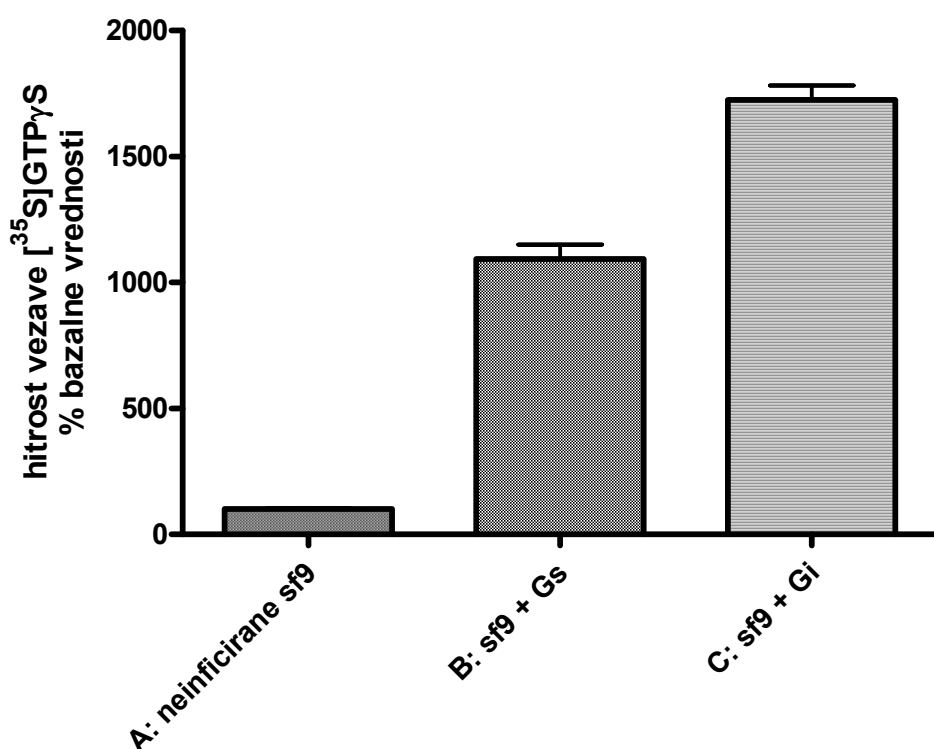


Slika 14: Učinek mastoparana (0,1 mM) in galnona (0,1 mM) na začetno hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na plazemske membrane iz korteksa podganjih možganov. Stolpci predstavljajo srednjo vrednost štirih neodvisnih meritev; prikazane so tudi standardne deviacije.

Z grafa je razvidno, da mastoparan in galnon povečata začetno hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine za 1,5- oziroma 2-krat v primerjavi z bazalno vrednostjo, kar je v skladu z rezultati iz literature (38, 39). Ker mastoparan in galnon delujeta na različne skupine G-proteinov – mastoparan na G_i in G_o (40), galnon pa na G_s in G_i (39), smo s tem potrdili ustreznost membran za naše poskuse.

Membrane iz celic sf9 s presežno izraženimi G-proteini vrste G_s in G_i

Primerjava začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na plazemske membrane iz celic sf9 s presežno izraženimi G-proteini vrste G_s in G_i z začetno hitrostjo vezave [³⁵S]GTP γ S na plazemske membrane iz neinficiranih celic sf9 je prikazana na Sliki 15.



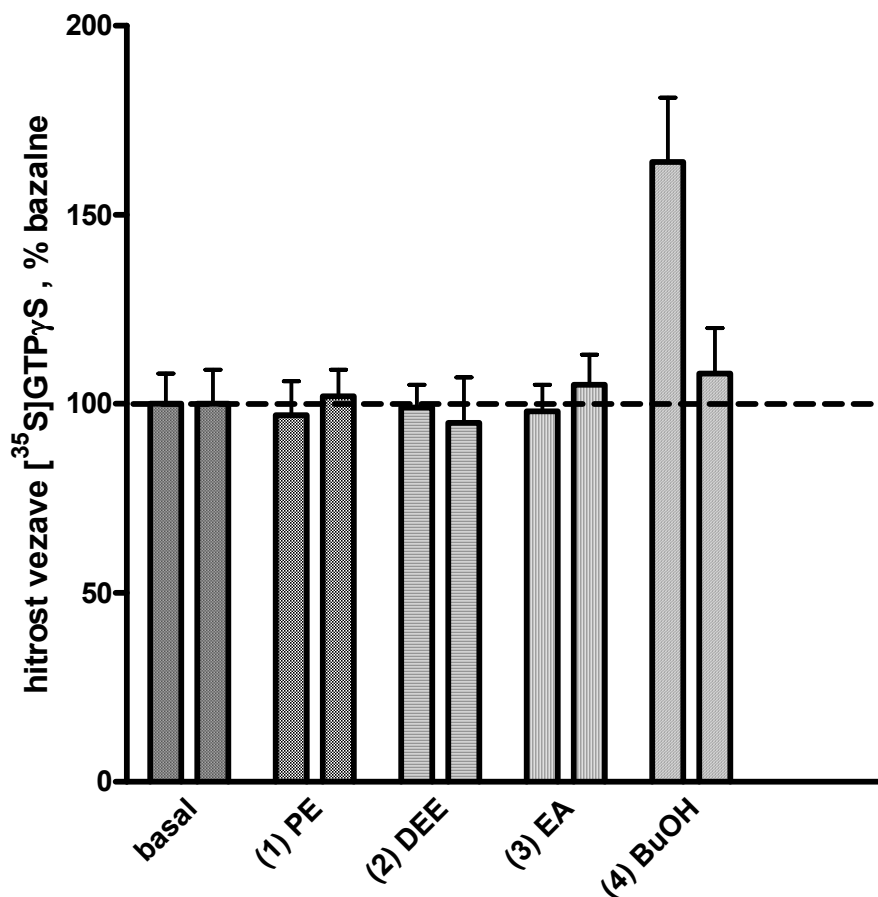
Slika 15: Začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na plazemske membrane iz neinficiranih celic sf9 (A: neinficirane sf9) ter s presežno izraženimi G-proteini vrste G_s (B: sf9 + G_s) in G_i (C:

sf9 + G_i). Stolpci predstavljajo srednjo vrednost štirih neodvisnih meritev; prikazane so tudi standardne deviacije.

Iz te slike se vidi, da je začetna hitrost vezave [³⁵S]GTPγS na plazemske membrane iz celic sf9 s presežno izraženimi Gs-proteini 11-krat in na tiste s presežno izraženimi Gi-proteini 17-krat večja od začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na plazemske membrane iz neinficiranih celic sf9. To pomeni, da je bilo izražanje rekombinantnih G-proteinov v celicah sf9 uspešno in je obeh vrst izraženih rekombinantnih G-proteinov res veliko več kot celicam sf9 lastnih G-proteinov v membranah iz neinficiranih celic sf9. S tem smo tudi potrdili, da so membrane uporabne za naše poskuse.

4.4 Vpliv topil

Topila lahko porušijo strukturo membrane in membranskih proteinov. Zato smo njihov vpliv preučili pri dveh različnih koncentracijah – pri največji teoretični koncentraciji, ki bi jo dobili, če bi v reakcijski zmesi (celotni volumen je 100 μL) imeli namesto 25 μL matične raztopine kar 25 μL ustreznega čistega topila ter pri desetkrat manjši koncentraciji (Slika 16).



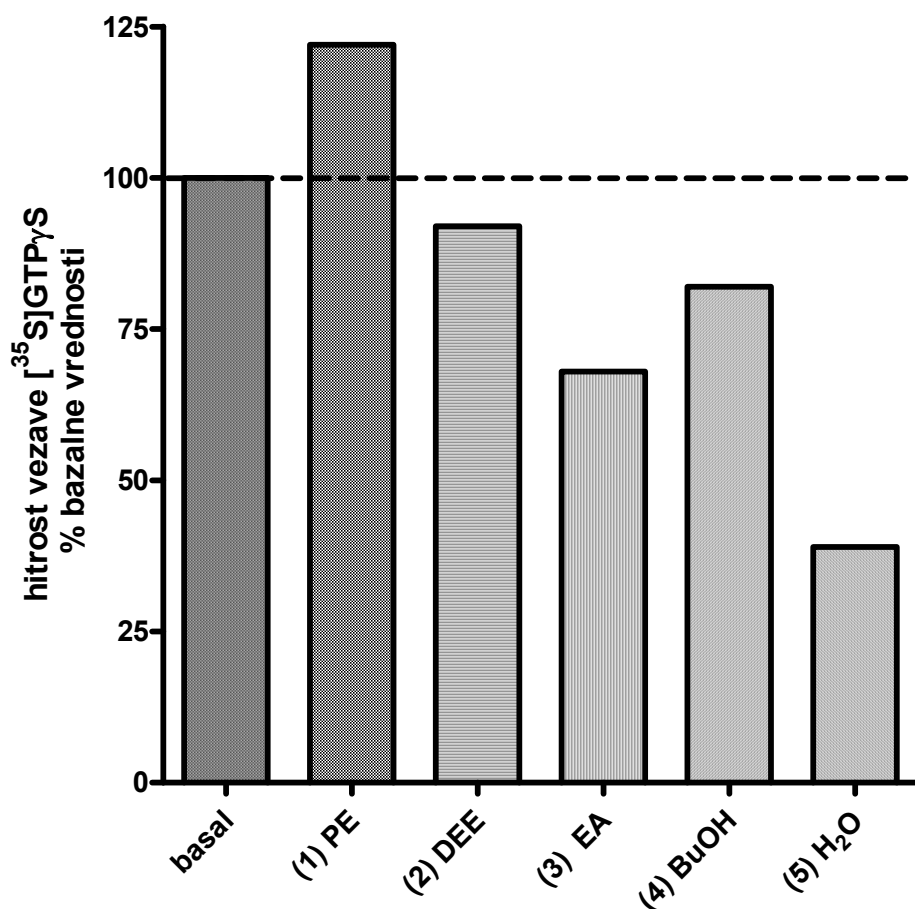
Slika 16: Vpliv topil na bazalno hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_i , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Višina stolpcev je srednja vrednost treh meritev, navpične črte na vrhu stolpcev ponazarjajo standardne deviacije. Kratice pomenijo: basal = bazalna vrednost brez topil; (1) PE = petroleter 25 μL /100 μL in 2,5 μL /100 μL ; (2) DEE = dietileter 25 μL /100 μL in 2,5 μL /100 μL ; (3) EA = dietilacetat 25 μL /100 μL in 2,5 μL /100 μL ; (4) BuOH = butanol 25 μL /100 μL in 2,5 μL /100 μL .

Vpliv topil na bazalno hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ smo preizkusili tudi na G-proteine vrste G_s , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9, ter na celoten nabor G-proteinov v membranah podganjega korteksa. Rezultati so bili praktično identični, zato tu prikazujemo le enega od diagramov. V vseh primerih se je pokazalo, da pri koncentraciji 2,5 μL topila v 100 μL raztopine topila ne vplivajo na aktivnost G-proteinov, pri desetkrat večjih koncentracijah, ki smo jih testirali zaradi varnosti, pa se je aktivacijski učinek pokazal samo pri butanolu. Ocenili pa smo, da je v naših matičnih raztopinah največji možen delež zaostalega topila v posameznih frakcijah največ do 0,3%, v vodnem preostanku pa je največ

do 0,1% butanola, saj se butanol zelo dobro meša z vodo. To pomeni, da so realne koncentracije topil v naših eksperimentalnih razmerah vsaj desetkrat manjše od tistih (2,5 μ L topila v 100 μ L), ki na G-proteine niso imele nobenega učinka.

4.5 Pregled vpliva velikih koncentracij vseh frakcij na G–proteine iz podganjega korteksa

Membrane, ki jih pripravimo iz korteksa možganov, so eden najboljših in tudi najpogosteje uporabljenih virov G-proteinov. Pomembno je, da so v teh membranah prisotne številne vrste G-proteinov in to v okolju, ki se močno približuje fiziološkim razmeram. Zato so bile membrane iz korteksa podganjih možganov za nas primerne za prvo oceno učinkov snovi iz vina na G-proteine. Poleg tega sta te učinke na podoben način preučevala že Katja Štern in Lovro Vidmar (22) in smo lahko svoje rezultate, ki so prikazani na Sliki 17, primerjali z njunimi.

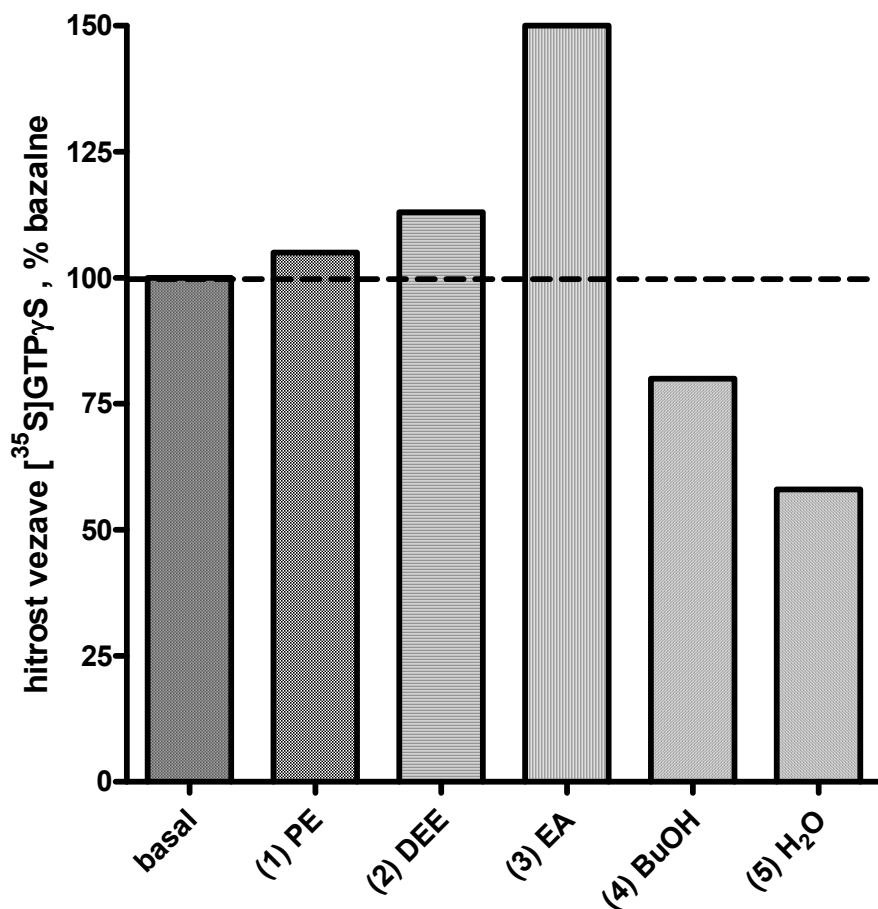


Slika 17: Vpliv ekstraktov iz vina pri največjih koncentracijah frakcij, ki smo jih lahko pripravili (Tabela 5), na hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine iz korteksa podganjih možganov. Višina stolpcev je srednja vrednost dveh meritev. Ker se rezultati pri nobenem stolpcu niso razlikovali za več kot 10 % in da bi prihranili material, dodatnih meritev nismo naredili. Zato v diagramu tudi ni standardnih deviacij. Kratice pomenijo: basal = bazalna vrednost brez topil; (1) PE = petroleter; (2) DEE = dietileter; (3) EA = dietilacetat; (4) BuOH = butanol; (5) H₂O = voda (preostanek po ekstrakciji z drugimi topili).

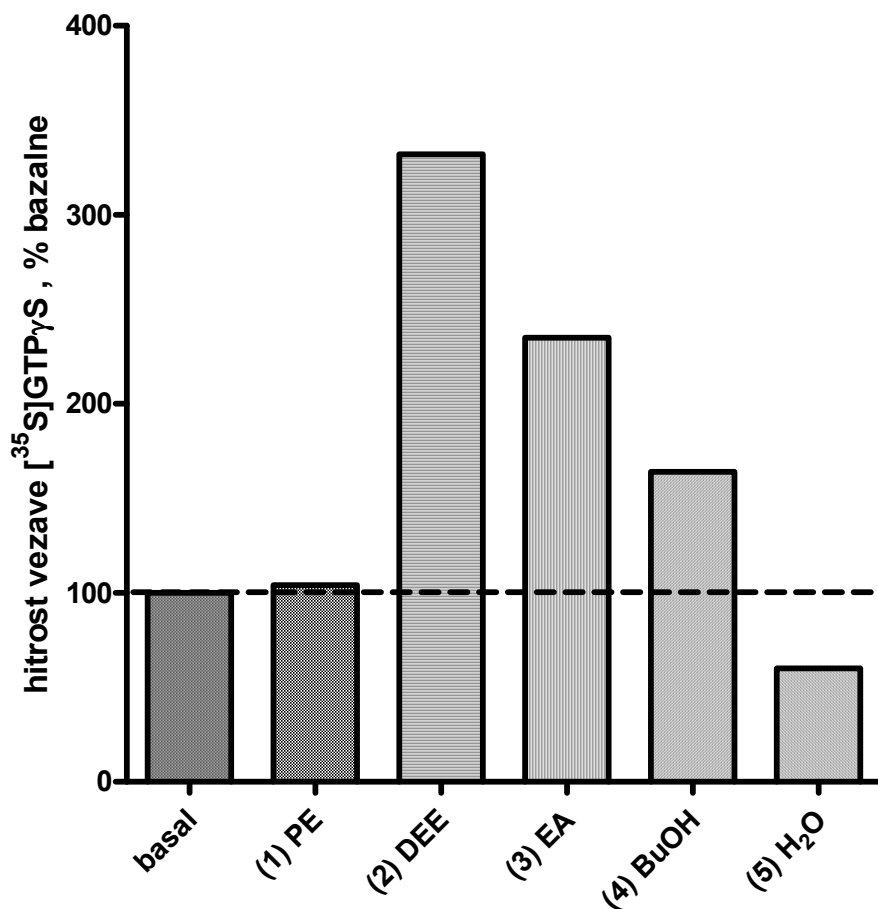
Rezultati so pokazali, da samo petroletrna frakcija aktivira G-proteine iz podganjega korteksa, vse ostale frakcije pa delujejo inhibitorno. Stopnja inhibicije se povečuje od bolj hidrofobnih k bolj hidrofilnim frakcijam.

4.6 Pregled vpliva enakih koncentracij vseh frakcij na G_s in G_i – proteine

Po tem, ko smo pokazali, da vinski ekstrakti različno vplivajo na mešanico G-proteinov iz korteksov podganjih možganov, nas je zanimalo, kako vplivajo na dve najpogostejši vrsti G-proteinov, G_s in G_i. Vpliv frakcij pri največjih koncentracijah, ki smo jih lahko pripravili (Tabela 5), na ti dve vrsti G-proteinov, je prikazan na Slikah 18 in 19.



Slika 18: Vpliv ekstraktov iz vina pri največjih koncentracijah, ki smo jih lahko pripravili (Tabela 5), na hitrost vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine vrste G_s, ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Višina stolpcev je srednja vrednost dveh meritev. Ker se rezultati obeh meritev pri nobenem stolpcu niso razlikovali za več kot 10 % in da bi prihranili material, dodatnih meritev nismo naredili. Zato v diagramu tudi ni standardnih deviacij. Kratice pomenijo: basal = bazalna vrednost brez topil; (1) PE = petroleter; (2) DEE = dietileter; (3) EA = dietilacetat; (4) BuOH = butanol; (5) H₂O = voda (preostanek po ekstrakciji z drugimi topili).

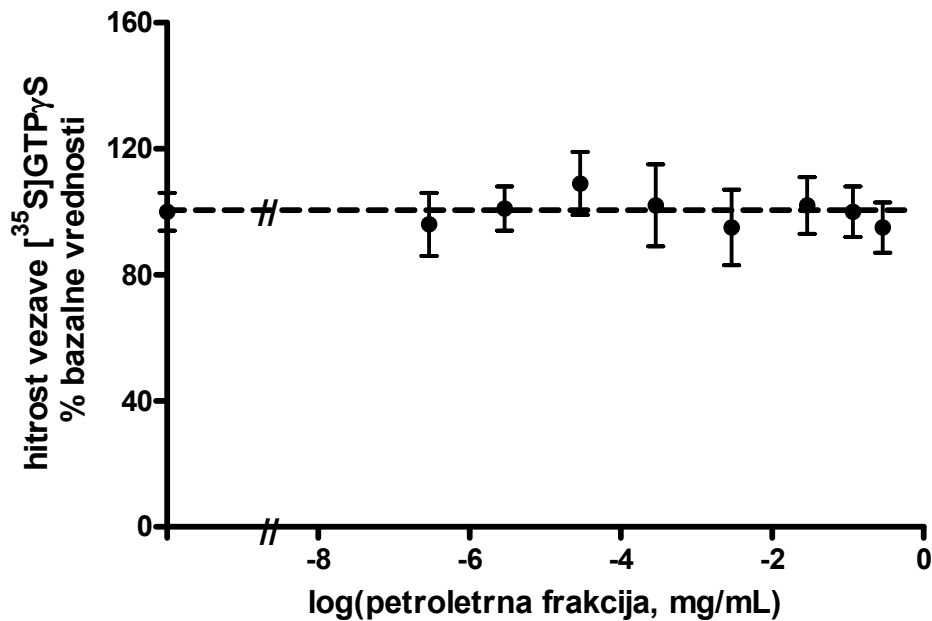


Slika 19: Vpliv ekstraktov iz vina pri največjih koncentracijah, ki smo jih lahko pripravili, na hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine vrste G_i, ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Višina stolpcev je srednja vrednost dveh meritev. Ker se rezultati obeh meritev pri nobenem stolpcu niso razlikovali za več kot 10 % in da bi prihranili material, dodatnih meritev nismo naredili. Zato v diagramu tudi ni standardnih deviacij. Kratice pomenijo: basal = bazalna vrednost brez topil; (1) PE = petroleter; (2) DEE = dietileter; (3) EA = dietilacetat; (4) BuOH = butanol; (5) H₂O = voda (preostanek po ekstrakciji z drugimi topili).

Sliki 18 in 19 kažeta različen vpliv frakcij na populacijo G-proteinov v membranah, pridobljenih iz celic sf9. Pri G_s vidimo, da petroletrna frakcija praktično nima učinka. Dietiletrna in etilacetatna frakcija aktivirata G_s-proteine, medtem ko jih butanolna in vodna frakcija inhibirata. Petroletrna frakcija prav tako nima učinka na G_i-proteine. Dietiletrna, etilacetatna in butanolna frakcija aktivirajo G_i-proteine, vodna frakcija jih inhibira.

S signifikantnostjo učinka se na tej stopnji nismo ukvarjali, saj smo učinek vsake izmed frakcij bolj podrobno preučili s kasnejšimi poskusi (Slike 20-29).

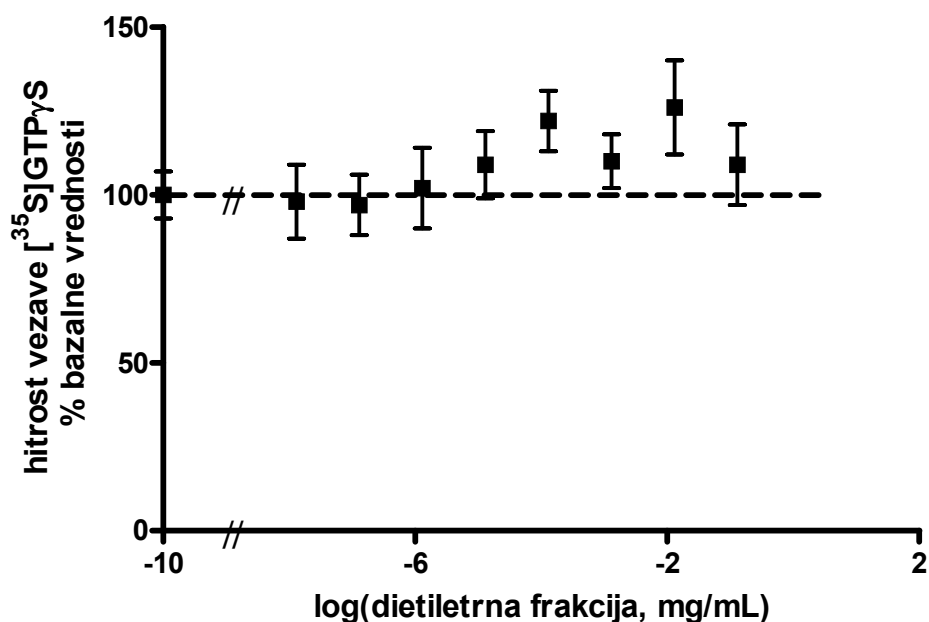
4.7 Vpliv petroletrne frakcije vina na proteine G_s



Slika 20: Koncentracijska odvisnost vpliva petroletrne frakcije vina na hitrost vezave [³⁵S]GTP_γS na G-proteine vrste G_s, ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije.

Rezultat kaže, da na celotnem koncentracijskem intervalu, ki smo ga uporabili, petroletrna frakcija ni imela učinka na G_s-proteine.

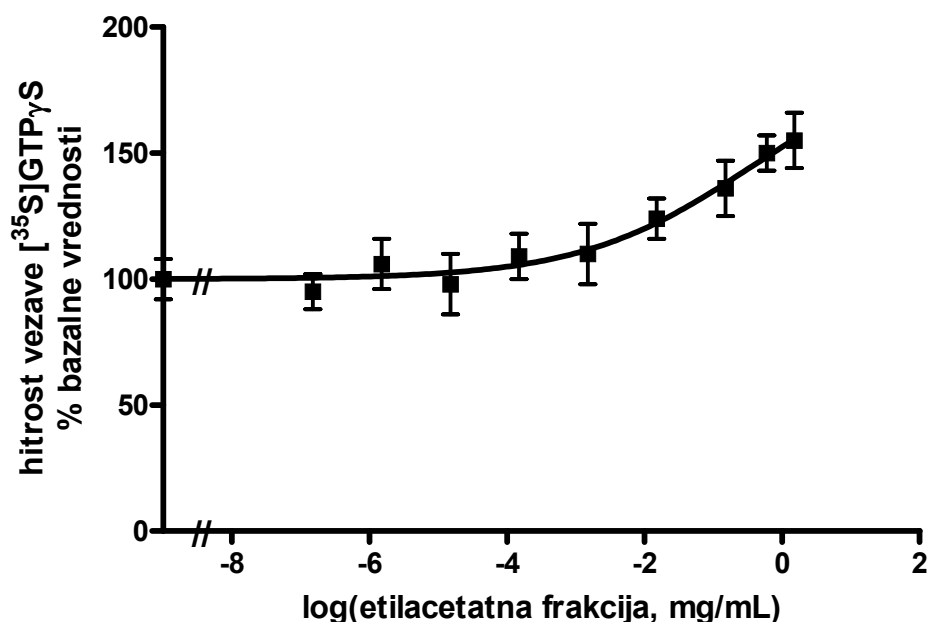
4.8 Vpliv dietiletrne frakcije vina na proteine G_s



Slika 21: Koncentracijska odvisnost vpliva dietiletrne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_s, ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije.

Diagram kaže na majhno aktivacijo G_s-proteinov pri večjih koncentracijah dietiletrne frakcije, vendar pa ni jasnega trenda pri naraščanju vrednosti, odstopanja pa so le pri dveh točkah večja od standardne deviacije. Zato mislimo, da odstopanja od linearnosti niso signifikantna.

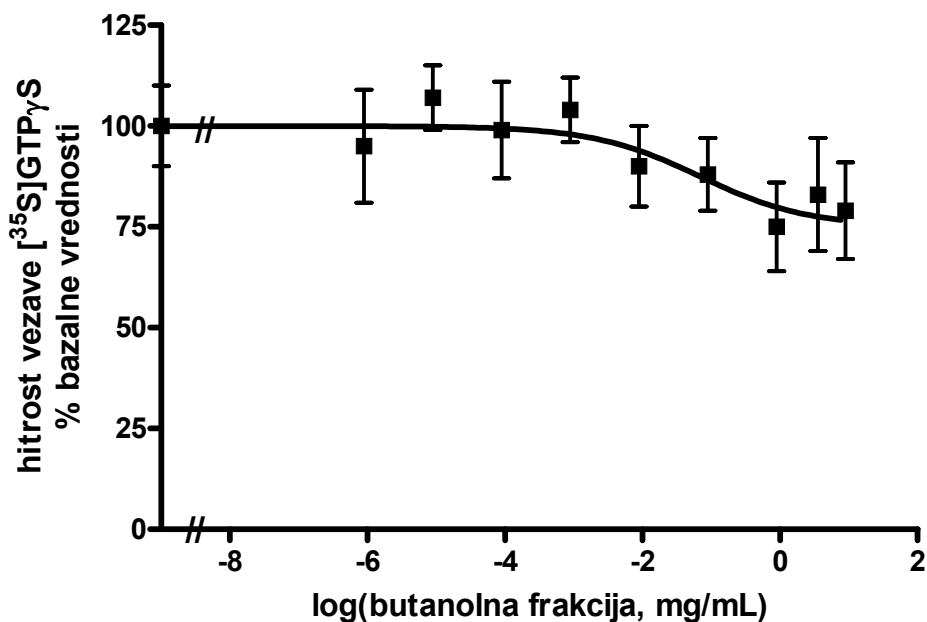
4.9 Vpliv etilacetatne frakcije vina na proteine G_s



Slika 22: Koncentracijska odvisnost vpliva etilacetatne frakcije vina na hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine vrste G_s, ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Prikazana je tudi točkam najboljše se prilegajoča krivulja, ki smo jo izračunali s pomočjo nelinearne regresije na osnovi enačbe za sigmoidno dozno odvisnost s spremenljivim Hillovim koeficientom.

Jasno je razvidna signifikantna aktivacija G_s-proteinov z etilacetatno frakcijo vina, ki pri največji uporabljeni koncentraciji za več kot 60 % preseže bazalno vrednost, žal pa nismo mogli narediti poskusov s še višjimi koncentracijami frakcije, ki bi pokazali maksimalno stopnjo aktivacije G_s-proteinov.

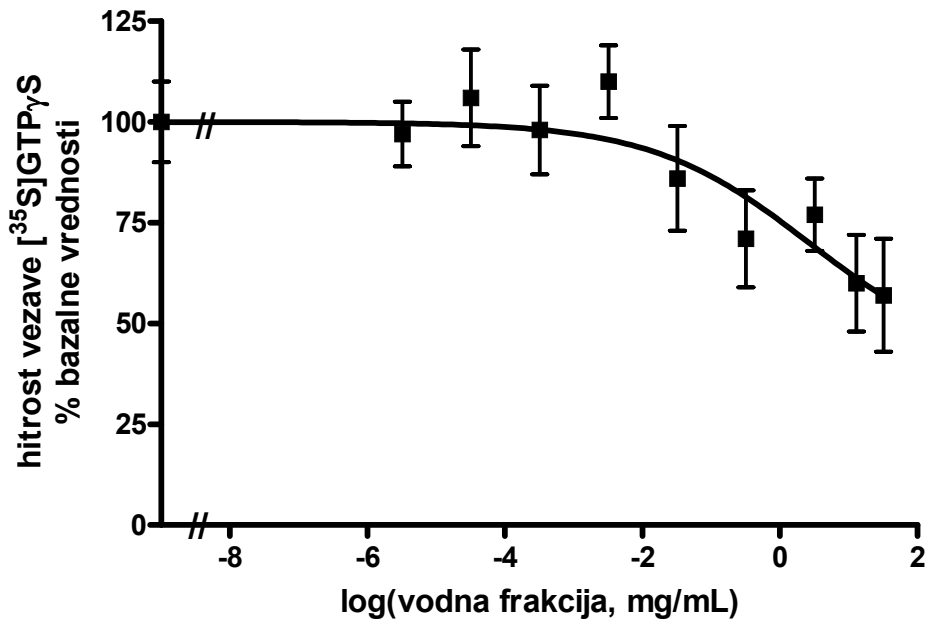
4.10 Vpliv butanolne frakcije vina na proteine G_s



Slika 23: Koncentracijska odvisnost vpliva butanolne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_s , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Prikazana je tudi točkam najbolje se prilegajoča krivulja, ki smo jo izračunali s pomočjo nelinearne regresije na osnovi enačbe za sigmoidno dozno odvisnost s spremenljivim Hillovim koeficientom.

Vidna je rahla inhibicija G_s -proteinov z butanolno frakcijo. Trend inhibicije je jasno prikazan, relativno velike standardne deviacije pa kažejo na le majhno signifikantnost tega učinka.

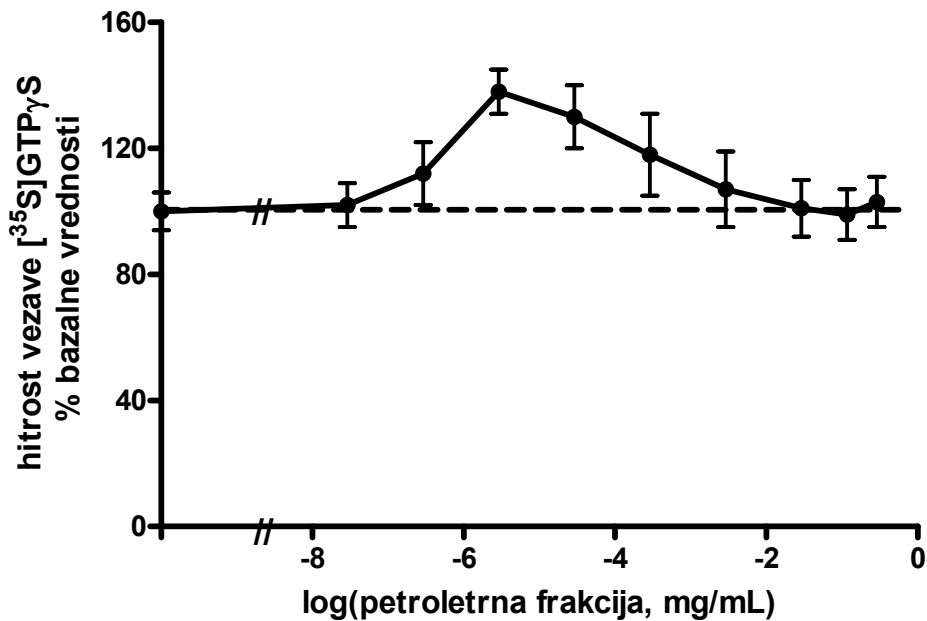
4.11 Vpliv vodne frakcije vina na proteine G_s



Slika 24: Koncentracijska odvisnost vpliva vodne frakcije vina na hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine vrste G_s, ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Prikazana je tudi točkam najbolj se prilegajoča krivulja, ki smo jo izračunali s pomočjo nelinearne regresije na osnovi enačbe za sigmoidno dozno odvisnost s spremenljivim Hillovim koeficientom.

Vodna frakcija, podobno kot butanolna, inhibira G_s-proteine, a je v tem primeru signifikantnost velika. Tudi tukaj nismo mogli bolj povečati koncentracije frakcije, kar bi nam morda omogočilo videti njen maksimalen učinek.

4.12 Vpliv petroletrne frakcije vina na proteine Gi

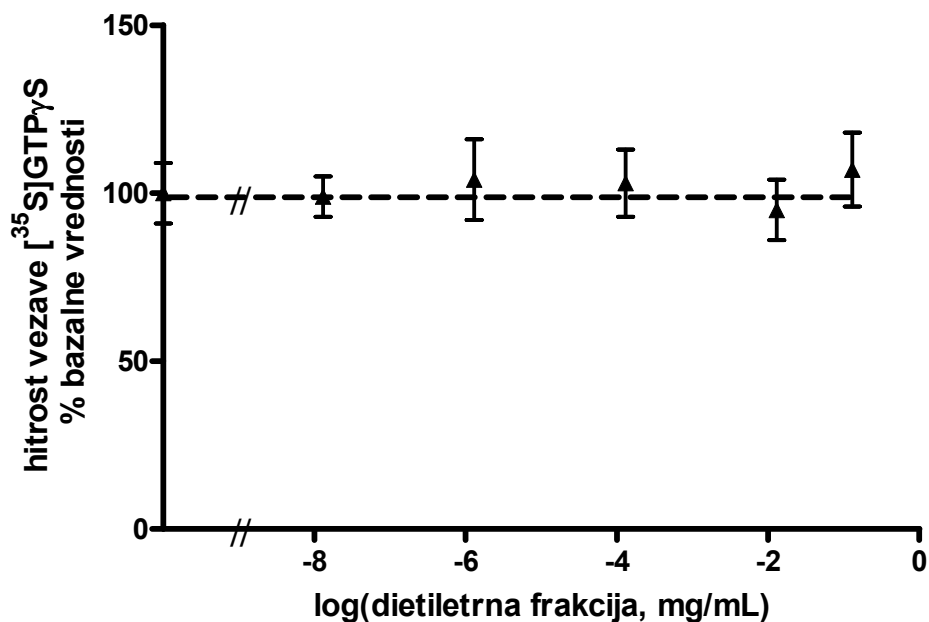


Slika 25: Koncentracijska odvisnost vpliva petroletrne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_i , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Točke smo povezali z ravnimi črtami, ker nismo našli nobene smiselne enačbe, na osnovi katere bi lahko s pomočjo nelinearne regresije dobili prilegajočo se krivuljo z ustrezno majhno vsoto kvadratov odmikov ($r^2 < 0,9$).

Petroletrna frakcija kaže navidezno kompleksen učinek na G_i -proteine; aktivacijo pri majhnih in vračanje na izhodiščno aktivnost pri velikih koncentracijah. Ker z nobeno od enačb za znane možne mehanizme delovanja snovi na G-proteine nismo mogli dobiti ustrezne krivulje, ki bi se dobro prilegala eksperimentalnim točkam, obnašanja petroletrne frakcije ne znamo razložiti. Morda bi bilo smiselno upoštevati možnost, da gre le za majhno motnjo v na splošno linearni odvisnosti učinka petroletrne frakcije.

Motnja bi glede na samo obliko grafa lahko bila posledica tvorbe nanometrskih agregatov, takega obarjanja pa s prostim očesom ne bi videli. Obstajajo metode, s katerimi lahko ugotovimo, ali se določena snov pri določenih koncentracijah obarja, vendar je v naših frakcijah za takšno določitev prisotnih preveč različnih komponent. Obenem pa obarjanja spet ne pričakujemo, saj smo v vodi raztopili ekstrakte vina, ki je vodna raztopina.

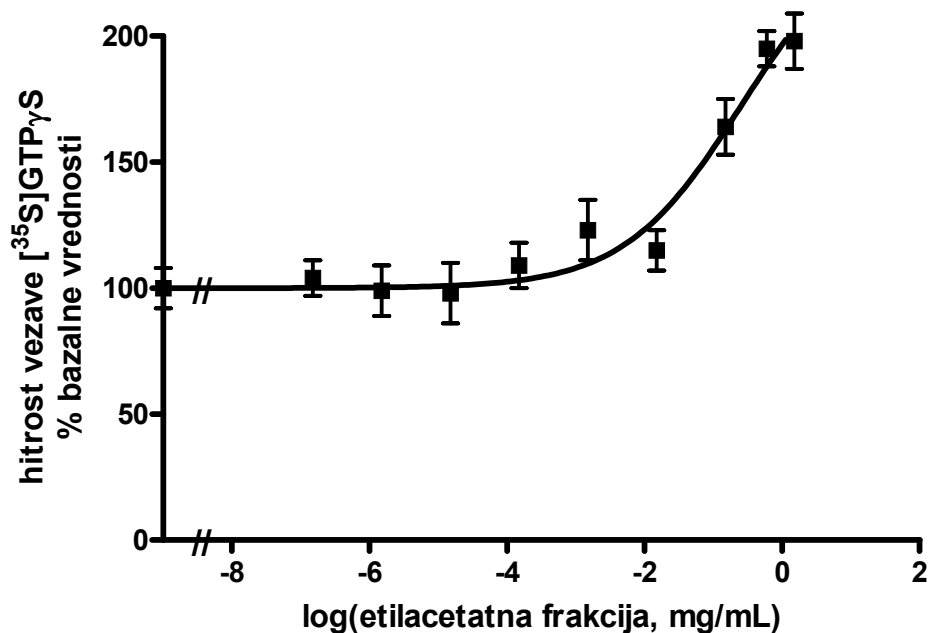
4.13 Vpliv dietiletrne frakcije vina na proteine Gi



Slika 26: Koncentracijska odvisnost vpliva dietiletrne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_i , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije.

Dietiletrna frakcija očitno nima učinka na G_i -proteine v celotnem preizkušenem koncentracijskem območju.

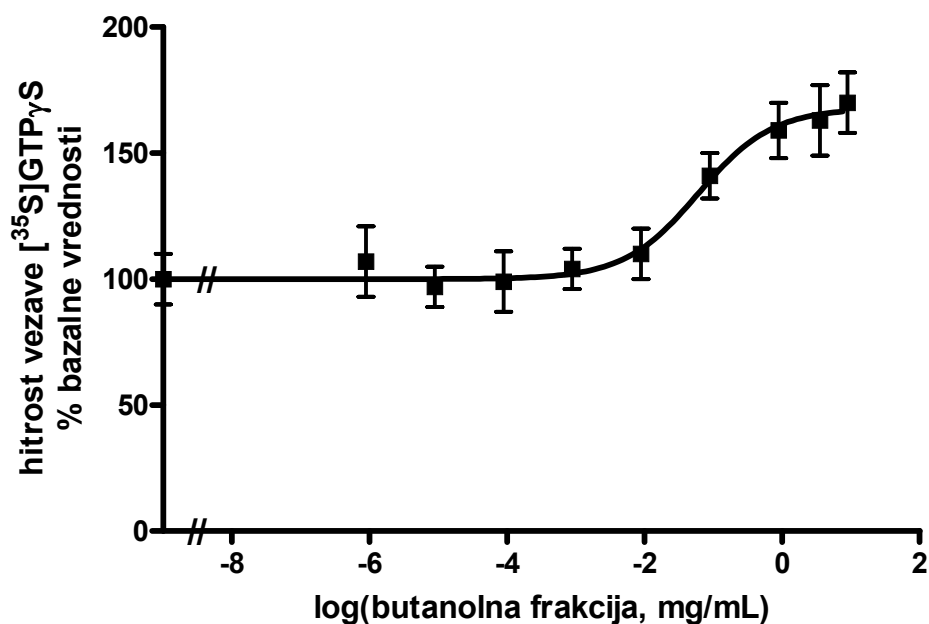
4.14 Vpliv etilacetatne frakcije vina na proteine Gi



Slika 27: Koncentracijska odvisnost vpliva etilacetatne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_i , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Prikazana je tudi točkam najbolje se prilegajoča krivulja, ki smo jo izračunali s pomočjo nelinearne regresije na osnovi enačbe za sigmoidno dozno odvisnost s spremenljivim Hillovim koeficientom.

Kaže se jasen in močan aktivacijski učinek etilacetatne frakcije na G_i -proteine. Tudi v tem primeru s koncentracijo nismo mogli iti dovolj visoko, da bi izmerili maksimalen učinek. Poudariti velja, da je učinek etilacetatne frakcije na G_i -proteine največji učinek, kar smo jih zaznali.

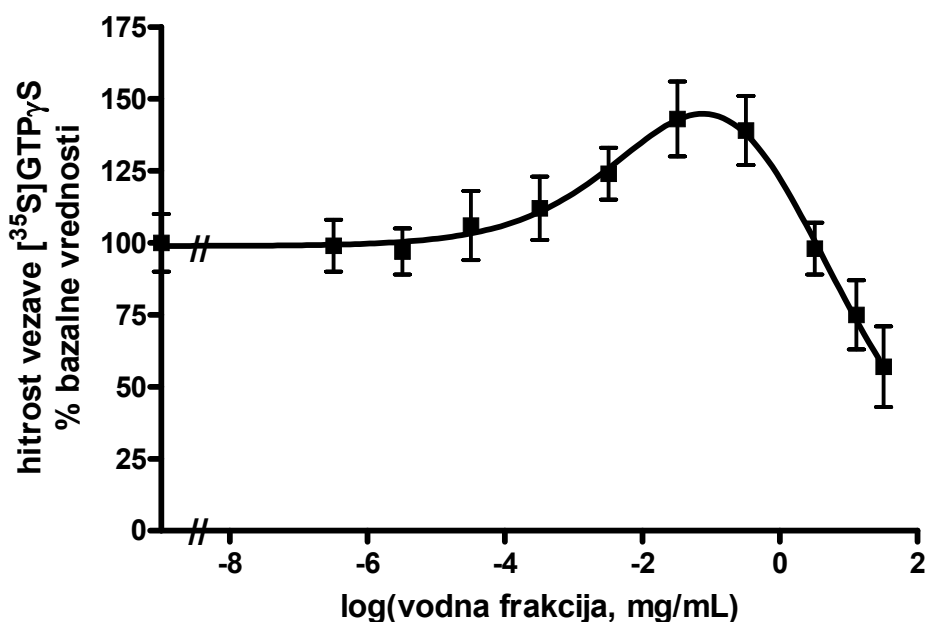
4.15 Vpliv butanolne frakcije vina na proteine Gi



Slika 28: Koncentracijska odvisnost vpliva butanolne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_i , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Prikazana je tudi točkam najboljše se prilagajajoča krivulja, ki smo jo izračunali s pomočjo nelinearne regresije na osnovi enačbe za sigmoidno dozno odvisnost s spremenljivim Hillovim koeficientom.

Tudi butanolna frakcija aktivira G_i -proteine, a nekoliko manj kot etilacetatna. Pri tej frakciji se zdi, da smo maksimalni učinek že dosegli, a bi za potrditev tega morali koncentracijo frakcije v reakcijski zmesi povečati še najmanj za desetkrat, kar pa ni bilo mogoče.

4.16 Vpliv vodne frakcije vina na proteine Gi



Slika 29: Koncentracijska odvisnost vpliva vodne frakcije vina na hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine vrste G_i , ki smo jih presežno izrazili v membranah insektnih celic sf9. Vsaka točka je povprečje 4 meritev, navpične črte skozi točke so standardne deviacije. Prikazana je tudi točkam najboljše se prilegajoča krivulja, ki smo jo izračunali s pomočjo nelinearne regresije na osnovi enačbe za dvofazno sigmoidno dozno odvisnost s spremenljivima Hillovima koeficientoma.

Vodna frakcija kaže kompleksen učinek na G_i -proteine. Pri majhnih koncentracijah aktivacijo in pri večjih inhibicijo aktivnosti G_i -proteinov. Obnašanje te frakcije se dobro sklada z modelom dvojne dozne odvisnosti liganda na efektorsko molekulo (G_i -protein).

5. RAZPRAVA

5.1 Izolacija frakcij vina

Želeli smo pripraviti frakcije vina, v katere bi na podlagi velikega razpona polarnosti topil prešlo čim več različnih snovi iz vina. Vino smo dealkoholizirali, saj etanol poškoduje membrane in vpliva na porazdelitev lipidov v njih ter seveda za to, da bi ne motil učinka drugih snovi, ki so nas zanimale. Substance, ki se niso ekstrahirale z nobenim topilom, so prisotne v vodnem preostanku. Izgubili bi lahko le hlapne substance, in sicer med rotavapiranjem, vendar so to pretežno aromatične snovi in ne polifenoli, katerim pripisujejo največ bioloških učinkov (10). Predpostavljamo, da je večina spojin v vinu dovolj stabilnih, da med ekstrakcijo in shranjevanjem niso razpadle (toplota, svetloba, reakcija s topilom) in so tako vsaj v eni izmed naših frakcij. Več kot verjetna pa je prisotnost istih snovi v večjih frakcijah.

Mase suhih frakcij kažejo, da se največ snovi ekstrahira v vodno frakcijo, ki se je zraven etilcetatne frakcije pri naših poskusih izkazala za najbolj aktivno. To seveda nakazuje, da je največja količina snovi, ki se ekstrahirajo iz vina, pretežno hidrofilna.

5.2 Vpliv posameznih topil na aktivnost G-proteinov

Na aktivnost G-proteinov vpliva velik nabor po strukturi različnih molekul. Nekatere, najbolj pa površinsko aktivne snovi in podobne spojine, med katere lahko prištevamo tudi amfifilna topila, vplivajo predvsem na integriteto membrane, v katero so G-proteini vstavljeni. Membrana ni pomembna le za lokacijo G-proteinov, ampak vpliva tudi na njihovo tridimenzionalno zgradbo in preko nje na njihovo aktivnost – spremenjena struktura membrane ali njena popolna razgradnja lahko aktivnost poveča ali pa tudi zmanjša. Površinsko aktivne snovi in nekatere druge podobne snovi pa lahko delujejo tudi z neposredno vezavo na G-proteine. Pri tem imajo lahko nespecifični v glavnem denaturacijski učinek, ki je posledica sprememb strukture G-proteinov, lahko pa delujejo tudi specifično, predvsem kadar se vežejo v žep za vezavo GTP oziroma GDP (kot npr. AlF_3 (42)) ali v

njegovo neposredno bližino. Zato smo morali preizkusiti vpliv posameznih topil na aktivnost G-proteinov, saj ta močno vplivajo na strukturo membrane, lahko pa bi delovala tudi specifično. Ugotovili smo (Slika 16), da pri najvišji uporabljeni koncentraciji, ki vsaj desetkratno presega največjo ocenjeno koncentracijo topil v naših vzorcih, topila ne povzročijo nobenega učinka na G-proteinih. Pri testiranju še desetkrat višjih koncentracij topil pa se je aktivacijski učinek pojavil le pri butanolu. Tako lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da je vpliv zaostalih topil pri testiranju vinskih frakcij na G-proteine zanemarljiv. To velja tako za membrane iz možganskih korteksov podgan, kakor tudi za membrane iz celic sf9, v katerih smo presežno izrazili G-proteine vrste G_s in G_i . Naše rezultate dobljene z membranami iz možganskih korteksov podgan lahko primerjamo z rezultati, ki sta jih na enakih membranah in z istimi topili dobila Katja Štern in Lovro Vidmar (22). Njuni rezultati so skoraj identični, le učinek največje koncentracije butanola je bil nekoliko manjši (122 % pri njiju in 168 % pri nas).

5.3 Vpliv frakcij vina na aktivnost G-proteinov

Določali smo učinek snovi iz vina na zmes G-proteinov, pridobljenih iz možganskih korteksov podgan in na rekombinantne G-proteine vrste G_s in G_i .

Najprej smo pri vseh vrstah G-proteinov primerjalno testirali vpliv visokih koncentracij vinskih frakcij, da bi dobili pregled največjih možnih učinkov (Slike 17-19). Rezultati kažejo, da imajo frakcije pri velikih koncentracijah različne učinke, od aktivacije do inhibicije, nekatere frakcije pa ne spremenijo aktivnosti G-proteinov. Pokazale pa so se tudi razlike med različnimi vrstami G-proteinov. Pri G-proteinih, pridobljenih iz možganskih korteksov podgan, smo zasledili aktivacijo le pri petroletrni frakciji, etilacetatna, butanolna in še posebej vodna frakcija pa G-proteine inhibirajo (Slika 17). Rezultati na rekombinantnih G-proteinih kažejo drugačen vzorec. G-proteine tipa G_s (Slika 18) petroletrna in dietiletrna frakcija na videz nekoliko aktivirata, a ta aktivacija ni signifikantna. Etilacetatna frakcija je edina, ki to vrsto G-proteinov signifikantno aktivira, njihova aktivnost se poveča za približno 50 % nad bazalno vrednostjo. Butanolna in vodna frakcija pa delujeta na G-proteine tipa G_s inhibitorno, slednja zmanjša bazalno aktivnost G-proteinov za približno 50%. Na G-proteine vrste G_i delujejo vinske frakcije spet drugače (Slika 19): petroletrna nima učinka, dietiletrna, etilacetatna in butanolna jih aktivirajo, vodna pa jih inhibira. Značilen je zelo močan

aktivacijski učinek dietiletrne frakcije, ki se kaže v približno 3,4-kratnem povečanju bazalne aktivnosti, pa tudi etiletrna ter butanolna frakcija sta zelo učinkoviti (približno 2,4 in 1,5-kratna aktivacija). Medsebojna primerjava teh rezultatov nam pove, da je vodna frakcija edina, ki pri velikih koncentracijah deluje na vse uporabljene vrste G-proteinov na enak način, saj vse najmanj 50-odstotno inhibira. To nakazuje, da so snovi v teh frakcijah res različne in da na različne vrste G-proteinov delujejo na različne načine. Za nespecifični inhibični učinek vodne frakcije bi lahko bile odgovorne tudi česlovine, ki so znane kot nespecifični inhibitorji različnih proteinov, vendar podatkov o njihovih učinkih na G-proteine nismo nasli.

Nekoliko podrobnejši vpogled v delovanje vinskih frakcij nam dajejo Slike 20-29, ki kažejo vpliv frakcij na rekombinantne G-proteine vrste G_s in G_i v odvisnosti od koncentracije posameznih frakcij. Statistično pomembno delovanje na G-proteine tipa G_s pripisujemo etilacetatni frakciji, kjer aktivacija G-proteinov z višanjem koncentracije frakcije raste in vodni frakciji, kjer se pojavi inhibicija, ki se prav tako veča z naraščanjem koncentracije frakcije. Iz obeh grafov (Sliki 22 in 24) je razvidno, da maksimalnega aktivacijskega učinka še nismo dosegli, vendar žal nismo imeli bolj koncentriranih frakcij, da bi te meritve lahko izvedli. Iz istega razloga tudi nismo mogli kvantitativno analizirati parametrov dobljenih krivulj (EC_{50} in Hillov koeficient), saj rezultati, čeprav jih je na formalni ravni mogoče dobiti, nimajo pravega pomena, ker temeljijo na nezanesljivo ocenjenih končnih vrednostih učinka.

Na G-proteine vrste G_i dietiletrna in petroletrna frakcija ne kažeta učinka, etilacetatna in butanolna frakcija pa jih aktivirata, pri čemer se učinek veča z naraščanjem koncentracije (Sliki 27 in 28). Posebej zanimiv je koncentracijsko odvisen dvojni učinek vodne frakcije na G-proteine vrste G_i , kjer se pri nizkih koncentracijah pojavi aktivacija, ki z višanjem koncentracije frakcije prehaja v inhibicijo G_i -proteinov (Slika 29). Ker smo vpliv zaostalih topil že izključili, predvidevamo, da je to posledica prisotnosti različnih snovi v frakcijah, izmed katerih nekatere delujejo aktivacijsko, spet druge pa inhibirajo G-proteine, vsaka od teh snovi pa deluje najmočneje v določenem koncentracijskem območju. Takšno prekrivanje učinkov aktivacije in inhibicije je nekaj običajnega, kadar imamo opravka z vzorcem, v katerem je več različnih snovi, se pa lahko pojavi tudi v primerih, ko imamo eno samo snov, v membranah pa je več različnih vrst G-proteinov, pri čemer preiskovana snov na nekatere deluje aktivatorno, na druge pa inhibitorno (43). Takšne dvojne krivulje kažejo, da se velikokrat ne moremo zanesti na učinek določene snovi pri njeni največji koncentraciji, zato smo tudi naredili eksperimente s koncentracijsko odvisnostjo frakcij vina.

Pri vseh vrstah preizkušenih G-proteinov vidimo, da jih aktivirajo bolj napolarne frakcije vina, bolj polarne snovi pa zraven aktivacije pri višjih koncentracijah kažejo še učinek inhibicije.

5.4 Primerjava naših rezultatov z izsledki podobnih raziskav

Katja Štern in Lovro Vidmar sta leta 2009 v delu za Prešernovo nagrado (22) preučevala vpliv vinskih frakcij na aktivnost G-proteinov iz podganjih korteksov, hkrati pa sta njihov učinek testirala še na predhodno skrčeni podganji aorti. Ugotovila sta, da petroletrna, etilacetatna in vodna frakcija statistično značilno aktivirajo G-proteine iz možganskih korteksov podgan, stopnje aktivacije in inhibicije pri posameznih frakcijah pa so skoraj identične kot pri naših rezultatih. Skrčene žile sta najbolje sprostiti petroletrna in vodna frakcija.

Barbara Solar je z enakimi frakcijami preizkušala učinek snovi iz vina na predhodno skrčeni podganji aorti v svojem diplomskem delu (30) leta 2009. Rezultati kažejo, da vinski polifenoli povzročajo sprostitvev žilnih obročkov preko endotelijskega NOS-sistema. To potrjujejo tudi mnoge študije in dodajajo, da pri nastanku NO sodelujejo G-proteini, predpostavljen mehanizem delovanja je regulacija eNOS. (44) Nekateri članki omenjajo kot ključno pri tem procesu $G\alpha_i$ -podenoto (45). Inhibicija G-proteinov vrste G_i se odrazi kot sprostitvev gladke mišične celice (24), zato bi tukaj lahko predpostavili povezavo z močnim sprostitvenim učinkom vodne frakcije na žilah (30) in našimi rezultati (Sliki 19 in 29). Obenem pa pri natančnejših opredelitvah mehanizmov različni članki navajajo nasprotujoče si zaključke (46), zato na tem mestu težko podamo zanesljivo razlago.

Izmed vseh vinskih polifenolov je v literaturi največ pozornosti namenjene resveratrolu, kjer so v ospredju ugodni učinki resveratrola pri kardiovaskularnih, nevrodegenerativnih in rakastih obolenjih. (6,47) V ospredju je predvsem antioksidativno delovanje resveratrola (48), preučuje se mehanizme vezave na receptorje (49) in delovanje na encime (50), vendar je tudi tukaj še mnogo neznank. O delovanju na G-proteine je zelo malo podatkov, nekateri poročajo o možnosti aktivacije heterotrimernih G-proteinov vrste G_i (45). To bi lahko bilo v skladu z našimi rezultati z etilacetatno in butanolno frakcijo (Sliki 27 in 28), vendar ne vemo, če se v

teh frakcijah res nahaja resveratrol, čeprav je to zelo verjetno, saj je Fantinelli pri podobni ekstrakciji vina našel resveratrol v diklorometanski in etilacetatni frakciji. (51)

5.5 Posredno ali neposredno delovanje snovi iz vina na G-proteine

Praviloma G-proteine aktivirajo ustrezni receptorji po vezavi določenih ligandov nanje. V našem primeru ne vemo, ali delujejo snovi iz vina na receptorje, niti kateri receptorji bi lahko bili kandidati za aktivacijo G-proteinov. Obstaja pa tudi možnost, da hidrofobne in amfifilne snovi iz vina preidejo membrano in se vežejo neposredno na G-proteine v celici in jih s tem aktivirajo ali inhibirajo, kakor je znano za nekatere druge snovi (glej uvod). V membranah iz celic sf9 je prisotnih bistveno manj receptorjev kot v membranah iz možganskega korteksa podgan, vendar pa njihovega števila in vrste ne poznamo. V literaturi se velikokrat uporabljajo G-proteini, izraženi v celicah sf9, za ugotavljanje neposrednih učinkov nanje, vendar se zavedamo, da to ni dovolj trden razlog, da bi verjeli v neposredno delovanje spojin iz vina na G-proteine. Dodatno je treba ponovno poudariti, da je v vseh preizkušanih frakcijah vina veliko različnih biološko aktivnih snovi, zato se lahko učinki različnih snovi kombinirajo; tako je bolj poglobljena interpretacija naših rezultatov težka.

5.6 Predlogi za nadaljnje delo

Jasno smo pokazali, da vinski ekstrakti učinkujejo na aktivnost različnih vrst G-proteinov. Glede na fiziološko pomembne učinke snovi iz rdečega vina mislimo, da bi bilo nadaljnje raziskave potrebno peljati v teh smereh:

- ◆ Vinske frakcije bi bilo potrebno še naprej frakcionirati, izolirati čiste snovi in jim določiti strukturo. Nato bi naše poskuse ponovili z očiščenimi snovmi. Pri tem ne smemo pozabiti, da je kemijska sestava vina kompleksna in obstaja možnost, da skupnega učinka ne moremo povzeti z enostavno vsoto posameznih učinkov, temveč je delovanje posameznih sestavin v vinu sinergistično.
- ◆ Zanimivo bi bilo testirati hlapne komponente, ki smo jih tokrat izpustili, na delovanje G-proteinov.

- ◆ Zraven G_s in G_i sta v tkivih pogosto prisotna še G_q in G_{11} podtipa G-proteinov, za katera je znano, da sodelujeta pri sproščanju in krčenju žil. Da bi imeli bolj celovit pregled nad učinkovanjem vinskih frakcij na G-proteine in tako sklepali na učinek na žile, bi morali naše poskuse ponoviti še na G_q in G_{11} vrstah G-proteinov, ki pa jih žal nismo imeli na voljo.
- ◆ Zanimivo bi bilo preizkusiti, ali snovi iz rdečega vina delujejo na aktivnost G-proteinov preko receptorja, kjer bi z ustreznimi antagonisti receptorjev določali odstotek vezave, ali pa so sposobne preiti membrano in se vezati neposredno na G-proteine.
- ◆ Za še podrobnejšo preučitev vpletenih signalnih poti pa bi morali ugotoviti, katere efektorske molekule (fosfolipaza C, adenilatna ciklaza in druge) se po aktivaciji G-proteinov aktivirajo in kam vodijo nadaljnje signalne poti, kjer bi se spet lahko poslužili uporabe ustreznih inhibitorjev.

6. SKLEP

Z raziskavo nam je uspelo pokazati, da frakcije rdečega vina statistično značilno učinkujejo na aktivnost G-proteinov, tako tistih, pridobljenih iz možganske skorje podgan, kot tudi dveh široko zastopanih podtipov, G_s in G_i . Ugotovili smo, da vsaka frakcija vpliva na aktivnost G-proteinov malo drugače, prav tako pa vidimo razlike v spremembi aktivnosti G-proteinov med posameznimi vrstami G-proteinov. S tem smo potrdili prve tri hipoteze.

Po primerjavi naših rezultatov z rezultati iz literature smo ugotovili, da se v mnogih primerih rezultati dobro skladajo. Kompleksna sestava naših frakcij pa seveda onemogoča bolj natančno določitev, na katere fiziološke mehanizme te frakcije vplivajo in na kakšen način. Tudi možnost, da nekatere snovi iz vinskih frakcij delujejo neposredno na G-proteine ni v neskladju z našimi rezultati, vendar na tej stopnji naših raziskav tega ne moremo zanesljivo trditi. Tako ostaja odgovor na našo četrto hipotezo, ki pravi, da bi lahko morebitna aktivacija ali inhibicija rekombinantnih G-proteinov v membranah celic sf9 nakazovala na neposredno vezavo učinkovin iz vina na G-proteine, odprt.

Težave z interpretacijo naših rezultatov jasno kažejo na kompleksnost problema, pa tudi na kompleksnost sestave vinskih frakcij. S tem smo potrdili peto hipotezo (za katero se zavedamo, da je trivialna), ki predvidi, da interpretacija dobljenih rezultatov in njihova korelacija s fiziološkimi učinki frakcij vina ne bo enostavna, dobili pa bomo vpogled, za katere frakcije in katere potencialne mehanizme delovanja bi bilo smiselno nadaljnje preučevanje. Mislimo, da bi raziskave v bodoče morale teči predvsem v smer identifikacije posameznih sestavin v vinu, čemu bi lahko sledila njihova natančnejša raziskava.

7. Literatura

1. Judež M, Klasično in sodobno vinarstvo, DZS, Ljubljana, 1981, 195-204.
2. Šinkovec S, Za vsakogar nekaj o vinu, ČZP, Kmečki glas, Ljubljana, 1984, 49-61.
3. Milena Suwa Stanojević, Tehnologija vina, Višješolski strokovni program živilstvo in prehrana, Zavod IRC, 2009, Ljubljana.
4. Terčelj D, Kultura vina na Slovenskem, Tovarna tradicij, Ljubljana, 2007, 63-72.
5. Jackson RS, Wine science: principles, practice, perception, 2nd Ed., San Diego, 270-316.
6. Waterhouse AL, Wine Phenolics, Ann N.Y. Acad Sci, 2002; 957: 21-36 .
7. D-Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability, Ann Ist Super Sanita 2007; vol.43, n.4: 348-361.
8. Kovačič A, Vpliv dodatka enoloških sredstev na antioksidativno stabilnost vina sorte Modri pinot, Diplomsko delo, Biotehnična fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2006.
9. Miklavčič A, Priprava in karakterizacija ekstraktov liofiliziranih vin, Diplomsko delo, Biotehnična fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2008.
10. Michalska M, Gluba A, Mikhailidis DP et al. The role of polyphenols in cardiovascular disease. Med Sci Monit 2010; 16(5): 110-119.
11. Rang HP et al. The Vascular System, Pharmacology, D.M. Rang HP, Ritter JM, Moore PK, Editor., Churchill Livingstone: Edinburgh 2003; 285-305.
12. Trybus KM. Regulation of smooth muscle myosin. Cell Motil Cytoskeleton 1991; 18: 81-85.

13. Trybus KM, Warshaw DM. Regulation of the interaction between smooth muscle myosin and actin. *J Cell Sci Suppl* 1991; 14: 87-89.
14. Spiegel MA. G proteins, receptors, and disease. *Contemporary Endocrinology*, Humana Press Inc., USA, 1998; 1-13.
15. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; 349: 117-77.
16. Nuoffer C, Balch WE. GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 949-90.
17. Pfeffer SR. GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol* 1992; 2: 41-6.
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/GTPase>, 3.9.2010.
19. http://en.wikipedia.org/wiki/Heterotrimeric_G_protein , 9.6.2010.
20. Lambright DG, Sondek J, Bohm A et al. The 2.0 Å crystal structure of heterotrimeric G protein. *Nature* 1996; 379: 311-9.
21. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein coupled receptors. *Pharmacol Therapeut* 2003; 99: 24-44.
22. Štern K, Vidmar L. Vpliv izoliranih naravnih substanc rastlinskega izvora na aktivnost G-proteinov, Delo za Prešernovo nagrado, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2009.
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/G-protein>, 6.6.2010.
24. Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D. *Color atlas of pharmacology*. Thieme, Stuttgart - New-York, 2000.

25. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signaling. *Nature* 1993; 365: 403-6.
26. Logothetis DE, Kurachi Y, Galpe J et al. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarin K channel in heart. *Nature* 1987; 325: 321-6.
27. Bresjanac M, Bunc M, Črne-Finderle N et al. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9.izdaja, Univerza v Ljubljani, 2003
28. Alfredo C Cordova in sod., *The Cardiovascular Protective Effect of Red Wine*, Elsevier Inc., 2005.
29. Mario Dell Agli in sod., *Vascular effects of wine polyphenols*, Faculty of Pharmacy, Milan, Italy, 2004.
30. Solar B, *Izolacija biološko aktivnih snovi iz vina z delovanjem na izolirane žile podgane*. Diplomsko delo. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani, 2009.
31. McKenzie FR. Basic techniques to study G-protein function. V: Milligan G. *Signal Transduction. A practical approach*. Oxford, NY, Tokio: Oxford University Press, 1992: 33-9, 46, 52.
32. Bavec A, Jureus A, Cigić B, et al. PD1 affects the GTP-ase activity of rat brain cortical membranes. *Peptides* 1999; 20(2): 177-84.
33. Lowry OH, Rosenbrough NY, Farr AL, et al. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
34. http://www.vistabiologicals.com/Services_Insect.htm, 13.6.2010.
35. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/insect_man.pdf, 22.6.2010

36. McKenzie FR. Basic techniques to study G-protein function. V: Milligan G. Signal Transduction. A practical approach. Oxford NY Tokyo: Oxford university press, 1992: 33-8, 51-3.
37. Bavec A, Hallbrink M, Langel U, et al. Different role of intracellular loops of glucagone-like peptid-1 receptor in g-protein coupling. Regul peptides 2003; 111 : 137-44.
38. Zorko M, Pooga M, Saar K, et al. Differential regulation of GTPase activity by mastoparan and galparan. Arch Biochem Biophys 1998; 349: 321-8.
39. Floren A, Sollenberg U, Lundstrom L, et al. Multiple interactions sites of galnon trigger its biological effects. Neuropept 2005; 39: 547-58.
40. Higashijima T, Burnier J, Ross EM. Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. J Biol Chem 1990; 265: 14176-86.
41. <http://www.molinspiration.com>, 18.11.2010.
42. De Boer AH, Van der Molen GW, Hidde BA et al. Aluminium fluoride and magnesium, activators of heterotrimeric GTP-binding proteins, affect high-affinity binding of the fungal toxin fusicoccin to the fusicoccin-binding protein in oat root plasma membranes. Eur. J. Biochem. 1994; 219: 1023–1029.
43. Hällbrink M, Saar K, Östenson C-G et al. Effects of vasopressin-mastoparan chimeric peptides on insulin release and G-protein activity. Reg. Pept. 1999; 379: 45-51.
44. Marrero MB, Venema VJ, Ju H et al. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein coupled receptors, Biochem J. 1999; 343(Pt 2): 335–340.
45. Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM et al. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor α -Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells, The FASEB Journal. 2008; 22: 2185-2197.

46. Martin S, Andriambeloson E, Takeda K et al. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production, *Br J Pharmacol.* 2002; 135(6): 1579–1587.
47. Jefremov V, Zilmer M, Zilmer K et al. Antioxidative effects of plant polyphenols: from protection on G protein signaling to prevention of age-related pathologies, *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 2007; 1095: 449-457.
48. Toklu HZ, Mehmet Erşahin M, Şehirli Ö et al. Resveratrol improves cardiovascular function and reduces oxidative organ damage in the renal, cardiovascular and cerebral tissues of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *JPP* 2010; 62(12): 1784–1793.
49. Saeed SA, Connor JD, Imran et al. Inhibitors of phosphatidylinositide 3-kinase: effects on reactive oxygen species and platelet aggregation. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 238-243.
50. Haider U, Sorescu D, Griendling KK et al. Resveratrol suppresses angiotensin 2 induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 772-777.
51. Fantinelli JC. Effects of different fractions of red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury. *Life Sci* 2005; 76 (23): 2721-33.