

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

Katjuša REJA MOZETIČ

**ANALIZA MOLEKULSKIH MEHANIZMOV
DELOVANJA FENILBUTIRATA, FENILACETATA IN
NIKOTINA NA KVASOVKO *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO

Mentor: doc. dr. Uroš PETROVIČ

Nova Gorica, 2007

*Delo posvečam Maksu in Vasji-
morda bosta nekoč ponosna name...*

ZAHVALA:

Eksperimentalni del diplomskega dela sem opravljala na Odseku za Molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta Jožef Štefan. Zahvalila bi se vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvajanju eksperimentov. Posebno pa bi se rada zahvalila Mojci Mattiazzi za njeno potrpljenje in pomoč pri spremljanju mojega dela v laboratoriju.

Mentorju Urošu Petrovič se zahvaljujem za vodenje pri izdelavi diplomske naloge, za vse koristne nasvete, za pregled naloge in za njegovo pripravljenost in pomoč vedno, ko sem jo potrebovala.

Zelo sem hvaležne tudi vsem domačim, ki so mi bili v veliko pomoč v vseh letih študija. Nenazadnje bi se rada zahvalila možu Robiju, ki me je vzpodbujal pri odločitvi glede študija in v številnih kriznih trenutkih med samim študijem. Otrokoma Vasji in Maksu gre posebna zahvala za prenašanje moje umske in fizične odsotnosti v zadnji letih.

HVALA vsem!

Izjavljam, da sem avtorica priloženega dela.

Katjuša Reja Mozetič

ABSTRACT

Determining mechanisms of action for chemicals is crucial for optimizing their use. Phenylbutyrate (PB) and its metabolite phenylacetate (PA) are approved drugs for treating urea cycle disorder. Latest research show that they also demonstrate high efficiency in treating cystic fibrosis, diabetes type II and various forms of cancer. While several cellular targets for PB and PA have been proposed, their mechanism(s) of action remain unknown. Nicotine is the major addictive substance in tobacco and according to some studies it is a potential medication for several diseases, including Parkinson's and Alzheimer's diseases. A well-known cellular target of nicotine is nicotinic cholinergic receptor, yet little is known of its non-receptor mechanisms of action. To identify biological targets of PB, PA and nicotine, we investigated their effect on a model organism, yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Useful information was obtained by testing the sensitivity of ~4800 haploid deletion mutants to PB, PA and nicotine, a process termed chemical-genetic profiling. By comparing the results for PB and PA it was shown that PB is more toxic to yeast than PA, and that PB has, besides common target(s) with PA, also specific biological target(s). According to our results, PB and PA probably inhibit mevalonic metabolic pathway, and PB in addition affects protein folding in yeast. In line with our assumptions, yeast (lacking nicotinic receptor) is more resistant to nicotine than higher organisms. We demonstrate that nicotine affects telomere maintenance and coenzyme metabolism in yeast.

KEY WORDS: phenylbutyrate, phenylacetate, nicotine, yeast, chemical-genetic profiling

POVZETEK

Določitev mehanizmov delovanja kemikalij je ključno pri zagotavljanju njihove optimalne rabe. Fenilbutirat (PB) in njegov metabolit fenilacetat (PA) se uporabljata pri zdravljenju motenj v ciklusu sečnine. Novejše raziskave kažejo, da sta učinkovita tudi pri zdravljenju cistične fibroze, diabetesa tipa 2 in pri nekaterih vrstah rakastih obolenj. Čeprav so bile predlagane nekatere celične tarče PB in PA, pa njihuni mehanizmi delovanja še niso pojasnjeni. Nikotin je najpomembnejša substanca v tobaku, ki povzroča odvisnost, študije pa so razkrile potencialno rabo nikotina za zdravljenje Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni. Znana tarča nikotina je nikotinski acetilholinski receptor, zelo malo pa je znanega o njegovem nerekceptorskem delovanju. Za identifikacijo bioloških tarč PB, PA in nikotina smo proučevali njihov vpliv na modelni organizem, kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Koristne informacije smo dobili s testiranjem občutljivosti ~4800 haploidnih delecijjskih mutant na PB, PA in nikotin, s tehniko imenovano kemijsko-genomska analiza. Primerjava rezultatov za PA in PB nam je razkrila, da je PB veliko bolj toksičen za kvasovko kot PA in da ima PB, poleg skupnih tarč(e) s PA, specifično biološko tarčo(e). Naši rezultati kažejo, da PB in PA verjetno inhibirata mevalonatno metabolno pot in da ima PB vpliv na proces zvižanja proteinov v kvasovki. V skladu s pričakovanji je kvasovka bolj rezistentna na nikotin kot višji organizmi, saj nima nikotinskega receptorja. Pokazali smo, da ima nikotin vpliv na procese, ki so povezani z vzdrževanjem telomer in metabolizmom koencimov v kvasovki.

KLJUČNE BESEDE: fenilbutirat, fenilacetat, nikotin, kvasovka, kemijsko-genomska analiza

1 UVOD	1
1.1 PREGLED DIPLOMSKE NALOGE S CILJI.....	2
2 TEORETIČNE OSNOVE.....	4
2.1 TOKSIKOLOGIJA	4
2.1.1 Strupenost	4
2.1.2 Mehanizem delovanja kemikalije na organizem.....	5
2.1.2.1 Privzem kemikalije.....	5
2.1.2.2 Metabolizem kemikalije.....	6
2.1.2.3 Skladiščenje kemikalij.....	6
2.1.2.4 Delovanje kemikalije.....	7
2.1.2.5 Izločanje	8
2.1.3 Stresni odgovor celice.....	8
2.1.4 Učinek ksenobiotika na organizem	9
2.1.5 Toksikološke študije	9
2.2 KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM.....	10
2.2.1 Zbirka delecijskih mutant <i>S. cerevisiae</i> – YKO zbirka.....	13
2.2.2 Teoretična osnova kemijsko-genomske analize	14
2.3 FENILBUTIRAT (PB) IN FENILACETAT (PA)	17
2.3.1 Metabolizem fenilbutirata in fenilacetata v kvasovki <i>S. cerevisiae</i>	18
2.4 NIKOTIN.....	20
3 EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1 MATERIALI	23
3.1.1 Kemikalije.....	23
3.1.2 Pribor in drobna oprema	23
3.1.3 Laboratorijska oprema	23
3.1.4 Gojišča	24
3.1.5 Uporabljeni sevi kvasovke <i>S.cerevisiae</i>	24
3.2 METODE IN POSTOPKI.....	25
3.2.1 Gojenje kvasnih celic	25
3.2.2 Aseptična tehnika dela	25
3.2.3 Določanje inhibitornih koncentracije PB, PA in nikotina za rast kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	25
3.2.3.1 Izbrani sevi za določanje inhibitorne koncentracije	25
3.2.3.2 Priprava gojišč s testnimi koncentracijami PB, PA in nikotina.....	25
3.2.3.3 Postopek	26
3.2.4 Presejalni test: kemijsko-genomska analiza	26
3.2.5 Test z redčinami na agarnih ploščah	28
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	29
4.1 INHIBITORNE KONCENTRACIJE PB IN PA	29
4.2 INHIBITORNE KONCENTRACIJE NIKOTINA.....	31
4.3 REZULTATI PRESEJALNEGA TESTA	32
4.3.1 Kemijsko-genetski profil za fenilbutirat (PB).....	34
4.3.1.1 Analiza rezultatov kemijsko-genetskega profila za fenilbutirat (PB).....	34
4.3.1.2 Vpliv PB na metabolizem organskih kislin	36
4.3.1.3 Vpliv PB na proces tvorbe membranskih veziklov	37
4.3.1.4 Vpliv PB na celično signaliziranje	37
4.3.1.5 Avksotrofni sevi za aromatske amino kisline (AK) so občutljivi na PB	37
4.3.1.6 Stresni odziv celice na PB	38
4.3.1.7 Vpliv PB na proces translacije	39
4.3.2 Kemijsko-genetski profil za fenilacetat (PA).....	41

4.3.3 Kemijsko-genetski profil za nikotin.....	42
4.3.3.1 Vpliv nikotina na proces izrezovanja intronov.....	43
4.3.3.2 Vpliv nikotina na telomerazno aktivnost.....	43
4.3.3.3 Vpliv nikotina na metabolizem koencimov.....	43
4.3.3.4 Izločanje nikotina iz kvasne celice.....	44
4.3.3.5 Zaključki kemijsko-genomske analize za nikotin.....	44
4.4 PRIMERJAVA VPLIVOV DELOVANJA FENILACETATA (PA) IN FENILBUTIRATA (PB) NA KVASNO CELICO.....	45
4.4.1 Mutante, ki se enako odzivajo na fenilacetat in na fenilbutirat.....	46
4.4.1.1 PA in PB sta substrat Pdr12p transporterju.....	46
4.4.1.2 PA in PB inhibirata mevalonatno (MVA) biosintetsko pot v celici.....	46
4.4.2 Mutante, ki se specifično odzivajo samo na fenilbutirat.....	49
5 ZAKLJUČKI.....	51
6 VIRI.....	54
5.1 ČLANKI V REVIJAH.....	54
5.2 KNJIGE.....	58
5.3 ELEKTRONSKI VIRI.....	58

PRILOGE:

PRILOGA A - KEMIJSKO-GENETSKI PROFIL za PB.....	i
PRILOGA B - KEMIJSKO-GENETSKI PROFIL za PA.....	v
PRILOGA C - KEMIJSKO-GENETSKI PROFIL za nikotin.....	vi
PRILOGA D - REZULTATI TESTA Z REDČINAMI.....	ix
OKRAJŠAVE, OZNAKE IN TERMINOLOGIJA.....	xi
Okrajšave.....	xi
Mednarodne oznake za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	xi
Terminologija.....	xii

1 UVOD

V današnjem času človek vnaša v okolje okrog 200.000 okolju tujih kemikalij – ksenobiotikov (Hodgson in Levi, 1997:339). Razumevanje mehanizmov delovanja kemikalij in poznavanje tarč teh snovi v organizmih je izredno pomembno in uporabno, saj nam omogoča, da bolje ocenimo vplive na okolje in tveganja za človekovo zdravje, ter znamo ustrezno ukrepati pri izpostavljenosti toksičnim snovem. Večina sodobnih raziskav v farmaciji temelji na identifikaciji bioloških tarč novih farmacevtskih sredstev, vendar ostaja ogromno naravnih in sintetiziranih snovi, ki imajo še nerazjasnjene mehanizme delovanja na organizme (Brenner, 2004).

V zadnjem času nam novejšše eksperimentalne metode s področja kemijske genomike odkrivajo nove poglede na razumevanje mehanizmov delovanja kemikalij na celico in procese v njej. Vse te metode temeljijo na uporabi modelnih mehanizmov, ki omogočajo uporabo orodij za natančno poseganje v genom ter analize na ravni celotnega genoma. Pivska kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je priljubljen modelni evkariontski organizem za raziskovanje molekularnih mehanizmov delovanja ksenobiotikov (Brenner, 2004). Za raziskave je dostopna med drugim tudi zbirka delecijских haploidnih mutant kvasovke *S. cerevisiae*, kjer ima vsak sev sistematično izbit po enega izmed približno 6600 znanih genov te kvasovke, od katerih je približno 4800 neesencialnih. Test občutljivosti teh ~4800 sevov na izbrano kemikalijo – proces, ki ga imenujemo kemijsko-genomska analiza – nam da uporabne informacije o mehanizmi delovanja te kemikalije (Parsons in sod., 2004, 2006). Pri kemijsko-genomski analizi s proučevanjem fenotipa (hitrosti rasti) sevov delecijских mutant ugotavljamo vpliv ksenobiotikov na celične procese. Izbiti geni, ki povzročijo večjo občutljivost sevov na testno kemikalijo, identificirajo metabolne poti, ki ščitijo celico pred toksičnimi učinki kemikalije in nam tako razjasnijo mehanizme delovanja kemikalije na celico (Giaever in sod., 2004; Parsons in sod., 2004, 2006).

Podatki, ki jih dobimo iz raziskav s kvasovkami, nam služijo tudi pri razumevanju delovanja kemikalij na višje razvite organizme (človeka), saj so se skozi evolucijo osnovne biološke poti ohranile in tako je danes poznanih že veliko kvasnih homologov za sesalske proteine. Kvasovka *S. cerevisiae* je primeren modelni organizem tudi za identifikacijo tarč farmacevtskih sredstev na človeka, saj več kot 40% njenih proteinov vsebuje vsaj del ohranjenega zaporedja, ki ga najdemo vsaj v enem od predpostavljenih človeških proteinov in številni med njimi so vključeni v različne človeške bolezni (Baetz in sod., 2003).

V diplomskem delu smo analizirali molekularne mehanizme delovanja fenilbutirata (PB), njegovega metabolita fenilacetata (PA) in nikotina. Izbrane kemikalije so že leta prisotne v okolju zaradi široke proizvodnje in uporabnosti, čeprav njihove tarče v organizmih niso povsem znane in njihov način delovanja na organizme še ni popolnoma pojasnjen.

Fenilbutirat je kemikalija, ki vpliva na številne celične procese. V zdravstvene namene se uporablja že več kot 20 let pri bolnikih z motnjami ciklusa sečnine. Novejše raziskave kažejo, da je učinkovit tudi pri zdravljenju cistične fibroze, diabetesa tipa 2, anomalije srpastih celic in pri nekaterih vrstah rakastih obolenj (Liu in sod., 2004; Grzanowski in sod., 2002). PB se v organizmu presnavlja v fenilacetat (PA). Obe substanci naj bi delovali *in vitro* kot diferenciacijski agens na različne tipe transformiranih celic (Grzanowski in sod., 2002). Predlagane so bile številne razlage o

mehanizmi delovanja obeh substanc, vendar ostaja še marsikaj nerazjasnjena (Grzanowski in sod., 2002).

Nikotin je alkaloid rastlinskega izvora, največ ga vsebuje tobak (rod *Nicotiana sp.*). Čeprav vsebuje tobak številne kemikalije, je prav nikotin tista substanca, ki povzroča odvisnost od tobačnih izdelkov (Quik, 2004; Hukkannen in sod., 2005). Nikotin se zato uporablja kot dodatek farmakološkim sredstvom, ki pomagajo pri zdravljenju odvisnosti od kajenja (Quik, 2005). Študije pa so razkrile potencialno rabo nikotina tudi za zdravljenje Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni (Quik, 2004). Znana tarča nikotina v organizmu je nikotinski acetilholinski receptor: nikotin se veže na aktivno mesto nikotinskega acetilholinskega receptorja, kar je med drugim vzrok za uporabo nikotina kot insekticidno sredstvo (Quik, 2004). Vendar je še veliko tarč nikotina in/ali njegovih metabolitov v organizmih ostalo neidentificiranih, prav tako so še nepojasnjene nekatere metabolne poti, v katere je vključen nikotin v organizmu (Quik, 2004).

1.1 PREGLED DIPLOMSKE NALOGE S CILJI

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo želeli pridobiti dodatne informacije, ki bi razjasnile biološke učinke PB, PA in nikotina na evkarionsko celico.

- V prvem delu smo z osnovnimi mikrobiološkimi tehnikami določili ustrezne inhibitorne koncentracije PB, PA in nikotina na kvasovko *S. cerevisiae*.
- Sledila je kemijsko-genomska analiza PB, PA in nikotina: proučevali smo rast sevov delecijjskih haploidnih mutant kvasovke *S. cerevisiae* na gojiščih z dodano testno substanco v predhodno določeni inhibitorni koncentraciji in jo primerjali z rastjo teh sevov na gojiščih brez testne substance.
- Nekatere izbrane seve iz zbirke delecijjskih mutant, ki so bili v kemijsko-genomski analizi občutljivi na PB, smo dodatno testirali z redčitvenim testom na agarnih ploščah. Testirali smo rast teh sevov na gojiščih z dodano predhodno določeno inhibitorno koncentracijo PB oziroma PA, saj nas je zanimalo, če se ti sevi enako odzivajo na PB in na PA.

Za lažjo nadgradnjo in za razumevanje mehanizmov delovanja PB, PA in nikotina, smo v pisnem delu diplomskega dela najprej naredili kratek pregled toksikologije in razložili osnovne procese, v katere so vključene kemikalije v organizmu. Nadaljevali smo s kratkim opisom modelnega organizma, kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in zbirke haploidnih delecijjskih mutant kvasovke, ter predstavili teoretično ozadje kemijsko-genomske analize. Poglavlje smo zaključili z opisom PB, PA in nikotina, kjer smo navedli fizikalno-kemijske lastnosti in možnosti uporabe teh snovi, ter opisali znano farmakokinetiko in farmakodinamiko teh substanc v višjih organizmih in v kvasovki *S. cerevisiae*. Sledi tretje poglavje, v katerem je opisana metodologija dela, ki smo jo uporabljali v raziskavi. V poglavju rezultati in diskusija so prikazani vsi rezultati eksperimentalnega dela, ki smo jih ustrezno podkrepili z znanimi razlagami iz literature.

Pri delu smo se pogosto posluževali podatkovne zbirke *Saccharomyces Genome Database* (SGD), ki je dostopna preko spleta. To je zbirka genetskih in molekularnih bioloških informacij o kvasovki *S. cerevisiae*, s podatki o kvasnih genih in proteinih (njihovi opisi, klasifikacija znanih bioloških vlog, molekularne funkcije in lokalizacija le-teh v celici). Poleg tega zbirka omogoča dostop do literature o kvasovki. V tej zbirki

smo našli večino podatkov o genih, ki so nas pri delu zanimali, o njihovih produktih (proteinih) ter njihovih znanih genetskih ali fizičnih interakcijah.

Cilji tega diplomskega dela so bili:

- identificirati biološke procese in celične tarče, na katere vplivajo PB, PA in nikotin v kvasovki,
- primerjati molekulske mehanizme delovanja PB in njegovega metabolita PA na kvasno celico,
- rezultate našega raziskovalnega dela primerjati z že znanimi podatki iz literature,
- ekstrapolirati mehanizme delovanja PB, PA in nikotina na višje organizme (človeka) s pomočjo podatkov o znanih sesalskih homologih za gene kvasovke, ki smo jih identificirani kot tarče teh substanc.

Z diplomsko nalogo smo želeli testirati naslednji hipotezi:

1. Ali imata PB in PA identične biološke učinke? Prvotno so za zdravljenje motenj ciklusa sečnine uporabljajo PA, ker pa so ga bolniki težko prenašali zaradi neprijetnega okusa, ga je kasneje zamenjal PB, saj se večji del PB v organizmu metabolizira v PA (Kusamov in sod., 2003). Tudi nekatere predhodne študije o PB in PA navajajo, da imata obe substanci podoben biološki učinek (Grzanowski in sod., 2002; Witzig in sod., 2000). Zato smo v eksperimentalnem delu testirali vpliv PB in PA na rast delecijjskih mutant in iz primerjave rezultatov ugotavljali, ali imata obe substanci podoben mehanizem delovanja na celico.
2. Ali je kvasovka ustrezen modelni organizem za določanje molekulskih tarč nikotina? Znan biološki učinek nikotina je njegovo nevrotoksično delovanje na višje organizme (Quik, 2004), zato smo pričakovali, da je za kvasovke nikotin manj toksičen, kar smo želeli z eksperimenti tudi preveriti. Poleg tega smo želeli identificirati tudi morebitne nереceptorске tarče nikotina v kvasni celici.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 TOKSIKOLOGIJA

Toksikologija je veda, ki preučuje škodljive vplive kemikalij in fizičnih agensov (radiacija, hrup, temperatura...) na žive organizme. To je izrazito interdisciplinarna veda, s katero se poleg toksikologov ukvarjajo tudi zdravniki, veterinarji, farmacevti, kemiki, biokemiki, sanitarni inženirji, inženirji varstva pri delu, biologi in ekologi. Tudi v toksikologiji so se z desetletji razvile posamezne poddiscipline, kot so: klinična toksikologija, forenzična toksikologija, molekularna epidemiologija, industrijska in agrarna toksikologija, ter ekotoksikologija, če jih naštejemo le nekaj. Nekatere med njimi so postale že samostojne discipline.

Toksikologija - veda o strupih - je stara toliko kot človeški rod, saj so bili nedvomno že prvi ljudje soočeni z nekaterimi strupenimi rastlinami in živalmi. V preteklosti je pomenila pretežno znanje o uspešnem zastrupljanju z rastlinskimi, živalskimi ali mineralnimi strupi, bodisi pri lovu, v vojnah ali pa v vsakdanjem življenju. Prvi znani medicinski zapiski o strupih so na egipčanskih papirusih (Eberski papirus) iz leta 1500 pred našim štetjem (Hodgson in Levi, 1997:7).

Temelje sodobne toksikologije je v veliki meri postavila znanstvenica Rachel Carson z njeno kontroverzno knjigo *Silent Spring* (Nema pomlad) leta 1962, v kateri je opozorila na številne negativne učinke množične rabe pesticidov na ekosisteme in o nevarnosti teh kemikalij za razvoj raka pri človeku (Hodgson in Levi, 1997:8). Knjiga je sprožila veliko polemik, predvsem pa je vplivala na povečano zavedanje o morebitnih nezaželenih učinkih kemikalij in posledično prispevala k bolj nadzorovani rabi teh sredstev. Začela se je doba sodobne toksikologije, katere glavna naloga je zagotavljanje čim varnejše uporabe kemičnih snovi.

2.1.1 Strupenost

Interakcije med organizmom in njegovim okoljem so ključne za njegovo preživetje. Organizem mora vzdrževati stalne notranje pogoje, zato si z okoljem neprestano izmenjuje snovi in energijo. Komunikacija večinoma poteka preko majhnih molekul. Na molekularnem nivoju te molekule omogočajo (hraniva) ali inhibirajo (toksini) rast celice (Giaever in sod., 2004).

Strupenost ali toksičnost je lastnost koncentracije kemikalije in je biološko pogojena. Določena koncentracija neke substance je lahko zelo strupena za neko vrsto ali mutanto, na druge vrste pa nima kvarnega učinka. Toksičnost neke snovi je lastna molekuli te snovi, kar pomeni, da ta molekula vpliva direktno ali preko njenega metabolita na neko biološko aktivnost. Poznavanje fizikalno-kemičnih lastnosti toksične substance nam lahko veliko pripomore k razumevanju in napovedovanju njenega delovanja na organizme (Turk. Toksinologija..., 2004).

2.1.2 Mehanizem delovanja kemikalije na organizem

Študije mehanizma delovanja kemikalije na organizem proučujejo tako kinetiko kot dinamiko kemikalije v organizmih in zajemajo naslednje procese:

- privzem kemikalije,
- metabolizem kemikalije,
- skladiščenje kemikalije,
- delovanja kemikalije na organizem,
- izločanje kemikalije iz organizma.

2.1.2.1 Privzem kemikalije

Večina snovi, ki prehajajo biološko membrano, je lipofilnih. Mehanizmi, ki omogočajo substanci prehod celične membrane so: pasivni transport, aktivni transport s pomočjo transporterjev in vstop z endocitozo. Večina toksinov prehaja membrano s pasivnim transportom zaradi difuzije (Hodgson in Levi, 1997:33). Za biološki privzem kemikalije sta pomembna naslednja parametra:

- porazdelitveni koeficient (K_{ow}), ki je merilo za lipofilnost substance in je definiran kot razmerje med koncentracijo substance topne v 1-oktanolu in koncentracijo substance topne v vodi. Kemikalija z visokim K_{ow} je torej bolj lipofilna in zato lažje z difuzijo prehaja v celice (Hodgson in Levi, 1997:32).
- ionizacija kemikalije: snovi v ioniziranem stanju težje prehajajo lipidni dvosloj predvsem zaradi manjše lipofilnosti in večje možnosti za interakcije med substanco in membranskimi proteini. Stopnjo ionizacije snovi izračunamo s pomočjo Handerson-Hasselbachove enačbe:

$$\log(\text{neionizirana oblika}/\text{ionizirana oblika}) = pK_a - pH \quad (\text{za šibke kisline}) \quad (1)$$

$$\log(\text{ionizirana oblika}/\text{neionizirana oblika}) = pK_a - pH \quad (\text{za šibke baze}) \quad (2)$$

Iz enačbe je razvidno, da je toksičnost snovi, ki obstajajo v raztopini v ionizirani in neionizirani obliki (na primer šibke kisline in baze) pogojena s pH vrednostjo medija in K_a vrednostjo (disociacijska konstanta za šibke kisline in baze) te kemikalije (Hodgson in Levi, 1997:31). Kadar je pH medija enak pK_a (negativni desetiški logaritem K_a) kemikalije, je 50% kemikalije v ionizirani obliki. Šibke organske kisline so v kislem okolju, ko je pH manjši od pK_a , bolj toksične, ker je večji delež molekul v neionizirani obliki in zato lažje prehajajo biološke membrane. Podobno velja za šibke baze, na primer skupino aldehydov, ki so bolj škodljive v mediju z višjim pH (Hodgson, 1997:31).

Pri višjih organizmih je privzem kemikalije pogojen z vrsto izpostavljenosti in načinom vnosa kemikalije. Manjše in bolj nepolarne molekule se lahko absorbirajo skozi kožo, plini in lahko hlapne snovi pa se lahko vnašajo v organizem preko dihalnih poti. Redkejši je vnos snovi z injiciranjem – značilen je za nekatere strupene živali, ki preko pika ali ugriza vnesejo toksin v organizem, ter v medicini in veterini. Najpogostejša pot vnosa kemikalije je z zaužitjem, njena absorbcija pa je pogojena s pH vrednostjo medija v prebavilih (Turk. Toksinologija..., 2004).

2.1.2.2 Metabolizem kemikalije¹

Metabolizem je skupina procesov izgradnje in razgradnje kemikalije, v katerega je vključena skupina encimov, ki uporabljajo kemikalijo kot substrat. V procesih metabolizma se lipofilna snov, ki je prešla biološko membrano, bodisi modificira v bolj polarno snov, da jo celica lahko izloči, ali pa se transformira v obliko, ki jo celica lahko porabi. Biotransformacija kemikalije običajno poteka v dveh stopnjah:

- **faza I biotransformacije:** oksidacija, redukcija ali hidroliza kemikalije. Vsem tem reakcijam je skupno to, da povečajo polarnost in s tem reaktivnost spojini. Intermediati, ki se tvorijo v tej fazi, so lahko celo bolj toksični od začetnega substrata. Nekateri metaboliti se po tej fazi izločijo iz celice, ostali pa se dodatno modificirajo v drugi fazi.
- **Faza II biotransformacije – konjugacija:** na reaktivno skupino, ki se je kemikaliji dodala v prvi fazi, se veže neki metabolit: sulfat, sladkor, AK... Konjugirani produkti so večinoma manj toksični, zelo polarni in celica jih lahko izloči.

Najpomembnejši encimi, ki katalizirajo reakcije oksidacije, so citokromi P-450 in so prisotni v vseh evkariontih, ter v nekaterih prokariontih. Pri človeku jih največ najdemo v jetrih, ki imajo tudi najpomembnejšo vlogo v biotransformaciji ksenobiotikov in pri razstrupljanju organizma.

Metabolizem kemikalije v organizmu je genetsko pogojen in je odvisen tako od vrste organizma, kot od številnih drugih zunanjih (fizikalni pogoji, hranila...) in notranjih faktorjev (spol, starost, mutacije, rase...).

2.1.2.3 Skladiščenje kemikalij

V celici se lipofilne substance skladiščijo v maščobnih kapljicah, vodotopne snovi pa v lizosomalnih granulah oziroma v vakuoli. Večinoma gre za substance, ki jih celica prepozna kot energetska zalogo ali gradnike in jih zato shrani za kasnejšo rabo (na primer kovine, lipide). Celica s skladiščenjem snov umakne iz obtoka, tako le-ta nanjo nima več škodljivega vpliva, razen v primeru stradanja, ko celica začne uporabljati rezervne snovi (Drobne. Ekotoksikologija..., 2002).

Pri višjih organizmih se lipofilne snovi skladiščijo v adipoznem tkivu in se lahko kopičijo v prehranjevalni verigi – ta proces imenujemo biomagnifikacija.

¹ Vir podatkov tega podpoglavja: Hodgson in Levi, 1997:57-82.

2.1.2.4 Delovanje kemikalije

Kemikalija in/ali njen metabolit lahko v celici delujeta na različne celične komponente in povzročita strukturne ali funkcionalne spremembe, kar je tudi glavni vzrok za toksičnost te kemikalije. Interakcije med kemikalijo in celičnimi molekulami so lahko:

- Vezava kemikalije in/ali njenega metabolita na celične makromolekule (RNA, DNA, proteine). V večini primerov gre za reaktivne elektrofilne metabolite (molekule s pozitivno nabitimi centri), ki reagirajo s celičnimi nukleofili (molekule s negativno nabitimi centri), kot so proteini in nukleinske kisline (Hodgson in Levi, 1997:95). Kovalentna vezava ksenobiotikov na DNA je vzrok za genotoksičnost, vezava na proteine pa vpliva na denaturacijo le-teh (Drobne. Ekotoksikologija..., 2002).
- Delovanje kemikalije na celične membrane: ta način delovanja je značilen za skupino snovi, ki jih uvrščamo med citolizine. To je zelo heterogena skupina kemikalij, vsem pa je skupno to, da poškodujejo celično membrano, kar povzroči spremenjeno fluidnost in propustnost le-te, ter v končni fazi smrt celice (Turk. Toksikologija..., 2004).
- Interakcije med ksenobiotikom in vezavnimi mesti encimov vplivajo na celične procese, v katerih imajo ti encimi biološko funkcijo. Vsi procesi v organizmu so katalizirani in nadzorovani s pomočjo encimov. Encimska kataliza se prične z vezavo substrata na aktivno mesto encima. Interakcije med encimom in substratom so reverzibilne, ksenobiotik ali njegov reaktivni metabolit pa se lahko kovalentno vežeta na aktivno mesto encima. Na ta način inhibirata encim in ta ni več sposoben opravljati svoje biološke katalitske funkcije. Poleg aktivnega mesta imajo nekateri encimi še druga, regulatorna mesta, ki so ključna pri uravnavanju aktivnosti encima. Vezava molekule na ta mesta običajno spremeni konformacijo encimu in s tem postane le-ta bolj ali manj aktiven. Negativni učinek interakcij med ksenobiotikom in temi mesti na encimu se kaže kot zmanjšan nadzor celice nad katalitično aktivnostjo encimov.

Interakcije med ksenobiotiki in celičnimi molekulami so večinoma zelo specifične, zato se na določene molekule v celici vežejo le določeni ksenobiotiki in iz istega vzroka je toksičnost pri višjih organizmih navadno organsko-specifična, torej omejena na določene organe ali tkiva. Zelo specifične tarče ksenobiotikov so receptorji na membrani, v jedru ali citoplazmi.

Večina farmakoloških sredstev deluje kot inhibitor določenega procesa, tako da se veže na aktivno mesto encima. Rezultati študij kažejo, da je mnogo boleznih posledica okvarjenih genov, ki nosijo napačno sporočilo (mutacija) ali pa izvirajo iz motenj v prenosu tega sporočila (prenos signala v celici). Sodobne raziskave v farmaciji potekajo v smeri iskanja celičnih tarč za določeno substanco. Nova zdravila delujejo na tri različne ravni celične komunikacije: na proces sinteze proteinov, na prenos signala znotraj celice in na komunikacijo med celico in okoljem (zunanji receptorji) (Boyer, 2002:44). Raziskave farmakoloških sredstev v preteklosti so temeljile predvsem na končnih učinkih te substance na organizem, pri čemer je bil mehanizem delovanja substance na celične komponente večinoma nepoznan, kar je onemogočalo napovedovanje stranskih učinkov te substance (Brenner, 2004). Najbolj razvpit je primer talidomida, ki so ga najprej uporabljali kot uspavalno sredstvo, kasneje pa so ga začeli predpisovati tudi nosečnicam, saj so ugotovili, da lajša jutranje slabosti. Posledice so bile grozljive, saj se je zaradi uživanja talidomida v nosečnosti rodilo okoli 10.000 prizadetih novorojenčkov v 46 državah (Wikipedija. The thalidomide...).

2.1.2.5 Izločanje

Izločanje vključuje procese odstranjevanja nerabnih in odpadnih snovi. To je esencialni proces v vseh organizmih. Pri prenosu ksenobiotika ali njegovega metabolita iz celice ima pomembno vlogo aktivni transport. V ta proces izločanja so vključeni na primer p-glikoproteini (transporterji organskih ionov) in MRP proteini (angl. »multidrug resistance proteins«) – to je družina proteinov, ki omogočajo odpornost organizma na večje število različnih toksičnih molekul. Ti transporterji so locirani na celični membrani in s pomočjo hidrolize ATP prenašajo različne substance iz celice. Seznam substratov, ki jih izločajo ti transporterji iz celice, je zelo pester in vključuje med drugim lipide, anorganske kisline, ogljikove hidrate, kelate težkih kovin in steroide (Goossens in sod., 2003). MRP običajno sodelujejo samo pri prenosu ksenobiotika, na katerega so vezani izbrani konjuganti: glutation, glukuronska kislina ali sulfat. V fazi II biotransformacije se torej ksenobiotiku z dodajanjem izbranih spojin, poleg povečane vodotopnosti, omogoča tudi izločanje iz celice preko transporterjev (Hodgson in Levi, 1997:116-117).

Enocelični organizmi izločajo odpadne snovi v okolje skozi plazemsko membrano. Večcelični organizmi pa izločajo skozi posebne organe za izločanje – izločala. Pri človeku so najpomembnejša izločala ledvice in sečni mehur, določene snovi izločamo tudi s fecesom, skozi pljuča in kožo, organske lipofilne snovi pa se lahko izločajo tudi z materinim mlekom (Turk. Toksikologija..., 2004).

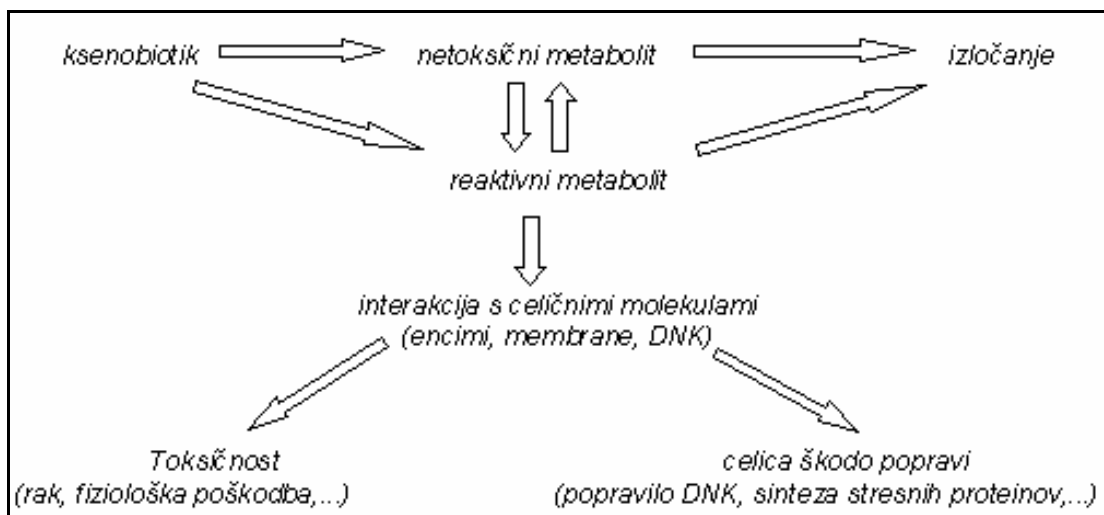
2.1.3 Stresni odgovor celice

V celici se je razvila vrsta zaščitnih mehanizmov, ki ščitijo celico pred škodljivimi delovanji kemikalij – to je odgovor celice na stres. Stresni proteini, na primer HSP (angl. »heat shock proteins«) so skupina proteinov, ki se sintetizirajo v večjih količinah v celici, kadar je le-ta izpostavljena nekemu stresorju (višja temperatura, ksenobiotiki, sprememba pH...). Izražanje stresnih proteinov je uravnavano s transkripcijskimi faktorji – HSF (angl. »Heat Shock Factor«). Mehanizem aktivacije HSF še ni popolnoma pojasnjen, nekatere študije so potrdile »hipotezo nenormalnih proteinov«, ki govori o vezavi poškodovanih proteinov na transkripcijske faktorje HSF (Drobne. Ekotoksikologija..., 2002).

Stresni proteini so prisotni v vseh celicah na vseh bioloških nivojih. Pod normalnimi pogoji stresni proteini izvajajo kontrolo nad proteini v celici: vežejo se na različne proteine in uravnavajo njihovo zvižanje, transport in popravilo. Ko je celica v stresu, stresni proteini preprečujejo denaturacijo in agregacijo proteinov, ter popravljajo denaturirane proteine.

Družina stresnih proteinov spada v skupino molekularnih šaperonov. Označujemo jih glede na molekularno maso, Hsp90 (molekularna masa 90kDa), Hsp70, Hsp60...

Na **sliki 2.1** so shematsko prikazani odnosi med procesi, ki potekajo v celici od vnosa ksenobiotika do njegovega izločanja iz celice. Iz sheme je razvidno, da procesi metabolizma kemikalije ne tvorijo samo netoksičnih metabolitov, ki jih celica izloči, ampak tudi reaktivne metabolite, ki imajo lahko toksični učinek na različne celične komponente. Poškodbe v celici ne vodijo nujno v celično smrt, saj je celica razvila mehanizme, ki popravijo nastalo škodo in povrnejo celico v homeostazo (Hodgson in Levi, 1997:95-96).



Slika 2.1 Odnosi med procesi, ki jih sproži kemikalija v celici
(vir: Hodgson in Levi, 1997:96)

2.1.4 Učinek ksenobiotika na organizem

Ksenobiotik lahko povzroči različne poškodbe na izpostavljenemu organizmu. V večini primerov strupena snov povzroči v določenem organu morfološko poškodbo, ki se odraža v nepravilnem delovanju prizadetega organa ali tkiva. Nekatere specifične substance, na primer acetil-holinesterazni inhibitorji, delujejo le na receptor in tako povzročijo le fiziološko motnjo, ne pa tudi spremembe v tkivu ali organu. Poškodbe so lahko reverzibilne ali ireverzibilne. Pri reverzibilni poškodbi si organizem opomore in s popravljivimi mehanizmi odpravi posledice. Ireverzibilna poškodba pa pomeni smrt ali trajno poškodbo, ki vpliva na motnje v delovanju organizma (Turk. Toksikologija..., 2004).

Razlikovati moramo med akutnim in kroničnim učinkom kemikalije na organizem. Dolgotrajno izpostavljanje določenim kemikalijam lahko vodi do nastanka rakastih obolenj, povzroči anomalije na zarodku ali inducira mutacije (kronični učinki). Akutni učinki pa se pokažejo najkasneje v dveh tednih po izpostavljenosti določenim kemikalijam (Hodgins, 1997:161).

2.1.5 Toksikološke študije

Razmah farmacevtske, kemijske, prehranske in drugih panog industrije v sredini prejšnjega (dvajsetega) stoletja je prispeval k široki potrošnji različnih substanc. Za večino teh substanc ne poznamo mehanizmov končnega delovanja na organizme. Številne okoljske katastrofe zaradi nekontrolirane rabe snovi z nepoznanim toksičnim učinkom so privedle do tega, da so danes toksikološke študije uzakonjene. Preden dobijo kemične snovi dovoljenje za uporabo, je njihov toksični učinek potrebno preveriti s pomočjo predpisanih in validiranih toksikoloških študij na celicah preprostih organizmov, celičnih oziroma tkivnih kulturah, izbranih živalih ali rastlinah in nato na ljudeh. Obseg preizkusa toksičnosti je odvisen od same snovi, kot tudi od zakonodaje in predpisov, ki veljajo v posamezni državi. Najbolj strogi kontroli so podvržena zdravila, pa tudi pesticidi, nekoliko manj pa industrijske kemikalije. Na podlagi tako pridobljenih izsledkov se po predpisani metodologiji pripravi ocena nevarnosti zaradi

izpostavljenosti in ocena tveganja zaradi uporabe testirane kemikalije (Turk. Toksinologija..., 2004).

V Evropski Uniji je bila decembra 2006 sprejeta nova zakonodaja za področje ravnanja s kemikalijami REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals), ki bo stopila v veljavo junija 2007. Nova kemijska zakonodaja je zasnovana tako, da bo zagotavljala višjo stopnjo ravni varovanja okolja in zdravja ljudi, ter vzpodbujala kemijsko industrijo k razvoju tehnoloških inovacij. Njen namen je zapolniti vrzeli, ki jih imamo v našem poznavanju tveganj zaradi uporabe kemikalij, prenesti dokazno breme na proizvajalce, ki bodo morali tako dokazati, da so kemikalije varne za uporabo in povečati nadzor nad uporabo kemikalij ali celo prepovedati uporabo nekaterih najbolj nevarnih kemikalij (Europa, Environment. REACH..., 2007).

Najbolj obsežne so ekotoksikološke raziskave, saj je v naravi okolje pogosto onesnaženo s kompleksno zmesjo kemikalij, kar povečuje težavnost napovedovanja učinkov posameznih kemikalij. Poleg tega je potrebno poznati kinetiko kemikalije v ekosistemu: pot vnosa, karenci, kopičenje po prehranjevalni verigi... Za ugotavljanje možnih vplivov kemikalije na stanje populacij v ekosistemu so zato potrebni laboratorijski testi biokemijskih, fizioloških, histoloških in populacijskih učinkov te kemikalije na različnih ravneh biološke organizacije.

Ne glede na to, kako obširne so študije, preden se kemična snov pojavi v široki uporabi, je nemogoče natančno predvideti vse možne neželene učinke, zato je potrebno spremljati učinke tudi potem, ko je kemikalija že na trgu, kar še posebej velja v humani in veterinarski medicini (Turk. Toksinologija..., 2004).

V toksikoloških študijah običajno proučujemo vpliv ksenobiotika na organizem z merjenjem odziva organizma na testno kemikalijo. Na izbiro ustrezne metode testiranja kemikalije vplivajo številni faktorji, kot so: fizikalno-kemične lastnosti te molekule, kako se bo kemikalija uporabljala in komu bo namenjena, načini vnosa, čas trajanja poizkusa, izbira modelnega organizma...

2.2 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM

Kvasovka *S. cerevisiae* je enocelični organizem iz kraljestva gliv. Čeprav jo človek uporablja že več kot 5000 let za peko kruha in pri pripravi alkoholnih pijač, je šele Louis Pasteur leta 1860 dokazal, da fermentacija poteka zaradi kvasovk. Danes je kvasovka *S. cerevisiae* zelo priljubljen evkariontski modelni organizem v molekularnih in celičnih raziskavah, predvsem zaradi njenega enostavnega gojenja, hitre rasti, nepatogenosti, ker je dobro poznana in omogoča različne genske manipulacije.

Razmnožuje se lahko vegetativno z brstenjem ali s spolnim razmnoževanjem, kjer se haploidni celici nasprotnih paritvenih tipov *Mata* in *Mata* združita v diploidno obliko, iz katere s procesom sporulacije vnovič nastanejo haploidne celice. Kvasovka lahko torej obstaja tako v haploidni kot v diploidni obliki, prehod iz ene v drugo obliko inducirajo rastni pogoji. Zaradi te lastnosti je zelo uporaben organizem za genetske študije, saj omogoča enostavno izolacijo recesivnih mutacij v haploidnih sevih. Diploidni sevi pa omogočajo izvajanje komplementacijskih testov.

V ugodnih pogojih traja celični cikel pivske kvasovke približno 90 minut (Sherman, 2002). Velikost in oblika celic je pogojena s fazo rasti in variira med različnimi sevi.

Običajno so diploidne celice elipsoidne, velikosti 5 x 6 µm, haploidne celice pa so okroglaste s premerom 4 µm (Sherman, 2002). Gojenje kvasovk je nezahtevno, prednost pred ostalimi mikroorganizmi je tudi ta, da jih lahko testiramo pod različnimi rastnimi pogoji. Kvasovka lahko raste v anaerobnih pogojih na glukozi s pomočjo fermentacije ali z respiracijo v aerobnih pogojih, kjer lahko poleg glukoze rabi tudi druge, nefermentativne vire ogljika, kot sta glicerol ali etanol. To sposobnost ima med evkariontskimi organizmi le kvasovka, zato je idealen organizem v raziskavah mitohondrijskih proteinov, potrebnih za respiracijo (Nelson. Lecture..., 2001). Uporaba kvasovk v raziskavah je privlačna tudi z ekonomskega vidika, predvsem zaradi nezahtevnega gojenja in kratkega generacijskega časa kvasovk, ki omogoča, da se v kratkem času iz ene celice pridobi veliko kvasnih celic.

Aprila 1996 so kvasovki *S. cerevisiae* (sevu S288C) določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma, kar je bil, po dveh prokariontskih, prvi v celoti določen evkariontski genom (Goffeau in sod., 1996). Čeprav je od takrat minilo že deset let, pa velikost kvasnega proteoma (število zaporedij, ki kodirajo proteine) še danes ni definirana. Prvotno so v genomu identificirali 6275 odprtih bralnih okvirjev (ORF, iz angl. »open reading frame«) daljših od 100 kodonov (Goffeau in sod., 1996). Še vedno odkrivajo nove majhne gene, veliko število že označenih ORF pa je postalo vprašljivih (Harrison, 2002). Po podatkih *Saccharomyces cerevisiae* Genome Snapshot z dne 28. decembra 2006, sestavlja genom kvasovke zaporedje 12.156.678 bp, od tega je 12.070.899 bp v jedru in 85.799 bp je mitohondrijske DNA. Predvidenih je 7985 genov, 6604 genov naj bi kodiralo proteine, od katerih je le 4462 preverjenih (**slika 2.2**), 299 genov kodira zapis za prenašalne RNA (tRNA), 76 genov za majhne jedrske RNA (snRNA) in 27 genov za ribosomsko RNA (rRNA). Geni kvasovke so v jedru nanizani na 16 kromosomih velikosti od 230 kbp do 1500 kbp.

V **tabeli 2.1** so podatki o velikostih genoma za bakterijo *E.coli*, kvasovko *S. cerevisiae* in za človeka. Vidimo lahko, da ima kvasovka zelo visok delež zaporedij v genomu, ki kodirajo proteine (70%), v primerjavi z človekom (1,2%). To pomeni, da je nekodirajoče DNA pri kvasovki malo. V skladu s tem so odkrili, da le 4% genov pri kvasovki vsebuje introne (Cooper in Hausman, 2007:179).

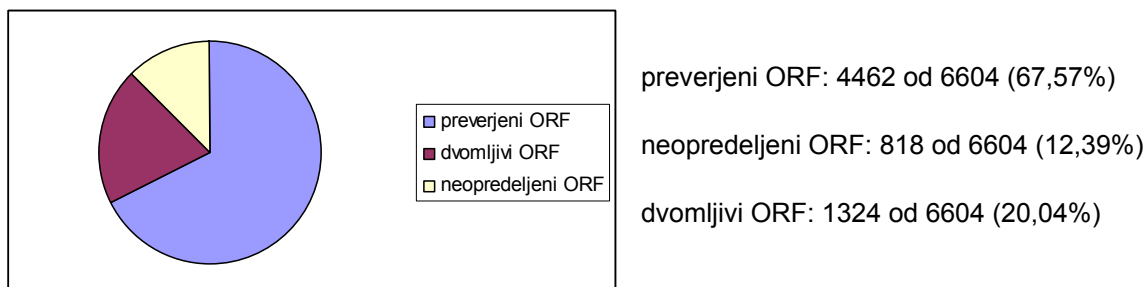
Tabela 2.1 Primerjava velikosti genoma človeka, kvasovke in bakterije: podatki v tabeli so glede na zgoraj navedene ažurirane podatke o kvasni celici zastareli in nam služijo zgolj kot primerjava.

(vir: Cooper in Hausman, 2007:176)

organizem	Velikost genoma (10 ⁶ bp)	Število genov	Delež protein kodirajoče DNA (%)
<i>E. coli</i> (bakterija)	4,6	4288	88
<i>S. cerevisiae</i>	12	~6000	70
<i>Homo sapiens</i>	3200	20.000-25.000	1,2

Število ORF v kvasovki *S. cerevisiae* - genov, ki naj bi kodirali proteine - je po določitvi nukleotidnega zaporedja celotnega genoma predmet številnih debat. Srž problema pri identifikaciji ORF izvira iz težav pri eksperimentalni potrditvi, da je neki ORF nefunkcionalen, saj obstaja vedno možnost, da dvomljivi ORF kodira zapis za protein, ki se sintetizira smo v specifičnih okoljskih pogojih (Fisk in sod., 2006).

Glede na eksperimentalne podatke in filogenetsko ohranjenost zaporedja so ORF razdelili v tri skupine z različno stopnjo verjetnosti, da kodirajo zapis za protein (Hirshman in sod., 2006). Delež posamezne skupine od 6604 trenutno napovedanih ORF je shematsko prikazan na **sliki 2.2**. Iz slike lahko vidimo, da je kar tretjina vseh identificiranih ORF uvrščena med dvomljive in neopredeljene ORF.



Slika 2.2. Grafični prikaz genov, ki kodirajo proteine v kvasovki: *preverjeni ORF* – v to skupino uvrščamo tiste ORF, katerih produkti so bili eksperimentalno potrjeni; *neopredeljeni ORF* – ima poznanega ortologa v vsaj eni vrsti, vendar trenutno še ni eksperimentalnih dokazov, da kodira zapis za protein; *dvomljivi ORF* – ni eksperimentalnih podatkov o obstoju produkta tega gena (mRNA ali proteina), prav tako ni poznanih ortologov v *S.cerevisiae* sorodnih vrstah. (vir podatkov: *Saccharomyces cerevisiae* Genome Snapshot z dne 28.12.2006; opisi skupin povzeti po Hirshman in sod., 2006)

Od znanih in napovedanih genov kvasovke je kar 73% genov neesencialnih (Tong, 2004), kar pomeni, da mutacija v kateremkoli izmed teh genov ne bo bistveno vplivala na fenotip kvasovke pri standardnih rastijskih pogojih. Tong in sod. (2001) razlagajo, da genotip s tako velikim deležem neesencialnih genov ščiti organizem pred genetskimi motnjami, kot so mutacije. Wagner (2000) navaja dva vzroka za nastanek neesencialnih genov: (i) razvoj funkcijskih homologov - mutacija v genu, ki ima funkcijskega homologa tako ne bo vplivala na končni fenotip in (ii) razvoj genetskih interakcij med geni z nesorodnimi funkcijami, kjer funkcija posameznega gena ni esencialna v metabolni poti, v katero je vključena ta skupina genov.

Skozi evolucijo so se osnovne biološke poti ohranile in tako potekajo številni celični procesi podobno v kvasovki in v višjih organizmih. Na primer, osnovni celični metabolizem in celična delitev sta podobna pri kvasovki in človeku, uravnavana pa sta s homolognimi proteini (Parsons in sod., 2003). Primerjava kvasnega in človeškega genoma je razkrila, da ima okrog 3000 proteinov v kvasovki homologe v vsaj enem izmed znanih človeških proteinov (Parsons in sod., 2003; Baetz in sod., 2004). Določitev funkcije vseh kvasnih proteinov bo zato pomemben korak pri razumevanju njihove vloge tudi v višjih organizmih (Winzeler in sod., 1999).

Kvasovka *S. cerevisiae* je primeren modelni organizem tudi za identifikacijo tarč delovanja farmakoloških sredstev, saj so med človeškimi proteini, ki imajo znane homologe med kvasnimi proteini, številni vključeni v različne bolezni (Botstein in sod., 1997; Baetz in sod., 2004). Zato je kvasovka zelo primeren modelni organizem pri razvoju zdravil za zdravljenje bolezni, ki so povezane z mutacijami, kot je na primer rak (Parsons in sod., 2003). Ker je kvasovka *S. cerevisiae* nepatogena vrsta in je genetsko zelo sorodna človeku patogenim vrstam, na primer vrsti *Candida albicans*, je tudi zelo uporaben vir za raziskave novih, bolj učinkovitih protiglivičnih zdravil (Parsons in sod., 2003).

Številni novi eksperimentalni pristopi z uporabo kvasovke kot modelnega organizma predstavljajo učinkovita orodja pri študiju proteinov ali metabolnih poti, ki so tarče farmakoloških sredstev (Baetz in sod., 2004; Petrovič in sod., 2005). Zbirka delecijjskih mutant kvasovke *S. cerevisiae*, kjer ima vsak sev sistematično izbit en gen, izmed okrog 6600 predvidenih, je edinstven vir za raziskovanje funkcijske genomike, ter analize sintetsko-genetskih in kemijsko-genetskih interakcij, saj lahko iz fenotipske analize sevov mutant dobimo koristne informacije o funkcijah in interakcijah genov (Winzeler in sod., 1999; Parsons in sod., 2003, 2004). Zbirka je opisana v poglavju 2.2.1.

Ažurirane in pregledne informacije o kvasovki *S. cerevisiae* so dostopne preko spleta v odličnih podatkovnih zbirkah. Najpomembnejše med njimi so:

- *Saccharomyces* Genome Database (SGD): zbirka genetskih in molekularnih bioloških informacij o kvasovki *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>),
- Munich Information Centre for Proteine Seqences (MIPS): zbirka vsebuje podatke o genomu in proteinih kvasovke (<http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/>),
- Yeast Protein Database (YPD): je podatkovna zbirka z informacijami o fizikalnih in funkcionalnih lastnostih proteinov (<http://www.proteome.com/>).

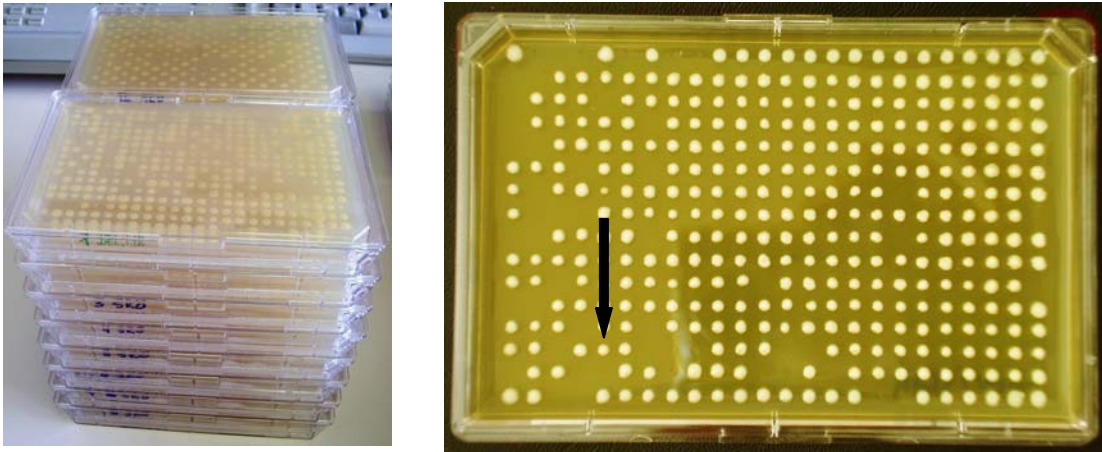
2.2.1 Zbirka delecijjskih mutant *S. cerevisiae* – YKO zbirka

Pri izdelavi YKO (angl. »Yeast Knock-Ot«) zbirke je sodelovalo več laboratorijev iz Evrope in Severne Amerike, člani *Saccharomyces* Genome Deletion Project Consortium (Winzeler in sod., 1999). Za raziskovalne namene so trenutno dostopne zbirke različnih mutant: haploidi obeh paritvenih tipov, homozigotni diploidi za neesencialne gene in heterozigotni diploidi z esencialnimi in neesencialnimi geni. Skupaj je na razpolago okrog 20.000 različnih mutant s sistematično izbitimi geni. Pri delu smo uporabljali zbirko haploidnih sevov serije BY4741 paritvenega tipa *Mata* z genotipom: *his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; xxxΔ::Kan^r*- posamezni geni so sistematično izbiti in zamenjani s kaseto za kanamicinsko rezistenco.

Natančno delecijo izbranega gena kvasovke omogoča posebna strategija za izbitje genov z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR). S to metodo so na mesto izbitega gena vnesli kaseto za kanamicinsko rezistenco (*KanMX*) in eno ali dve 20 nukleotidov dolgi zaporedji, ki sta specifični za vsak izbiti gen. Ta krajša zaporedja so kot nekakšne črtne kode in omogočajo identifikacijo posameznega seva v metodah, kadar se vzporedno testira več sevov skupaj v gojišču.

Izbitje približno 5% genov kvasovke, od približno 6600 predvidenih, zaradi večinoma nepoznanih razlogov ni uspelo. Rezultati kažejo, da je okrog 73% genov neesencialnih za rast na bogatem gojišču (Tong in sod., 2004), to pomeni, da lahko v laboratoriju gojimo vse haploidne seve s sistematično izbitim enim izmed teh genov. YKO zbirka vsebuje torej okrog 4800 mutant, ki imajo izbite neesencialne gene (*Saccharomyces* Genome..., 2003).

Celotna zbirka je dostopna na šestnajstih pravokotnih petrijevkah s trdnim YPD gojiščem in z gostoto 384 sevov na ploščo (**slika 2.3(a)**). Sevi so na posamezni plošči nanizani v šestnajstih vrstah in štiriindvajsetih kolonah. Zbirka ima pripadajoči seznam, kjer je vsak sev določen z izbitim genom, ORF oznako tega gena in z mestom seva v YKO zbirki (številka plošče, vrsta, stolpec).



Slika 2.3 (a) YKO zbirka: mutante so nanese na 16 plošč s trdnim YPD gojiščem in z gostoto 384 sevov na ploščo. (b) Mesto mutante *ost5Δ* v zbirki: na sliki so sevi tretje plošče, sev *ost5Δ* je označen s puščico in se nahaja na plošči v četrti koloni in v štirinajsti vrsti.

Primer iz seznama za sev *ost5Δ*: sev ima izbit gen *OST5* (ORF YGL226C-A) in se nahaja v zbirki z gostoto 384 sevov/ploščo na tretji plošči, v četrti koloni in v štirinajsti vrsti (**slika 2.3(b)**).

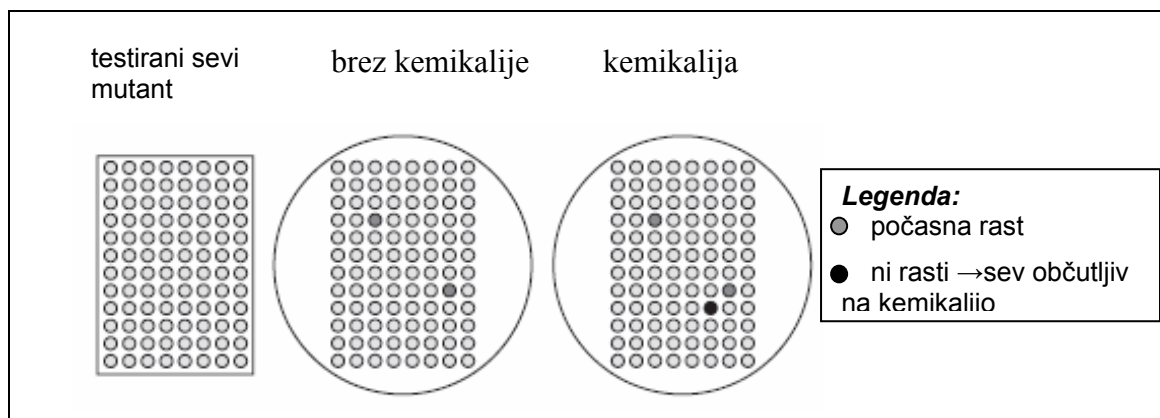
Gen	ORF	Plošča (384)	Vrsta (384)	Kolona (384)
<i>OST5</i>	YGL226C-A	3	14	4

Da ne bi izgubili povezave med sevom in njegovim mestom v zbirki, je potrebna pazljivost pri pravilni postavitvi plošče. Če jo postavimo tako, da je gojišče spodaj in sta odsekana robova na vrhu, štejemo vrste od zgoraj navzdol, kolone pa od leve proti desni - mesto 1/1 (prva vrsta in prva kolona) je tako v zgornjem levem kotu.

2.2.2 Teoretična osnova kemijsko-genomske analize

Določitev mehanizmov delovanja ksenobiotikov na organizme je osnovni problem v kemijski biologiji (Parsons in sod., 2006). Koristne informacije pri identifikaciji tarč kemikalije v celici lahko dobimo s testiranjem občutljivosti sevov iz YKO zbirke na to kemikalijo, s procesom imenovanim kemijsko-genomska analiza (Parsons in sod., 2004, 2006). Rezultati testa temeljijo na identifikaciji spremenjenih fenotipov (rasti) posameznih delcijskih mutant iz zbirke zaradi dodane kemikalije v gojišče, zato je ta metoda primerna za testiranje vseh kemikalij, ki vplivajo na rast kvasnih celic (Parsons in sod., 2006).

Parsons in sod. (2003) navajajo naslednje prednosti kemijsko-genomske analize: (i) omogoča testiranje kemikalije *in vivo* – tarče kemikalije (proteini, DNA, membrane) so v celičnem okolju, kjer jim je omogočena naravna konformacija in interakcije z drugimi celičnimi komponentami, (ii) je selektivna za snovi, ki lahko prehajajo celično membrano – zaradi podobne selektivnosti kvasnih in človeških celic, lahko pričakujemo, da snovi, ki prehajajo v kvasno celico, prehajajo tudi biološke membrane v človeških celicah in (iii) testiranje lahko večkrat ponovimo in razširimo.



Slika 2.4 *Kemijsko-genomska analiza*: delecije mutante se iz zbirke (levo) prenese na gojišče z dodano kemikalijo (desno) in na gojišče brez dodane kemikalije (v sredini). Obe gojišči inkubiramo toliko časa, da kolonijam mutant lahko primerjamo rast. S temno sivo barvo so na shemi označeni sevi, ki rastejo počasneje na obeh gojiščih, s črno barvo pa je označen sev, ki je občutljiv na kemikalijo, saj raste počasneje samo na gojišču z dodano kemikalijo, na gojišču brez kemikalije pa ima normalno rast.

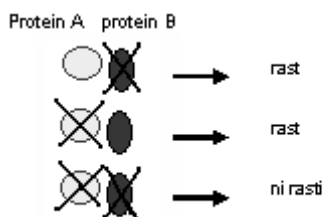
(vir: Brenner, 2004)

Na **sliki 2.4** je shematski prikaz kemijsko-genomske analize, kjer iz analize fenotipov (hitrosti rasti) delecijских mutant identificiramo kemijsko-genetske interakcije med kemikalijo in tistimi geni kvasovke, katerih produkti so vključeni v procese, ki so tarče te kemikalije (Brenner, 2004; Parsons in sod., 2003, 2004).

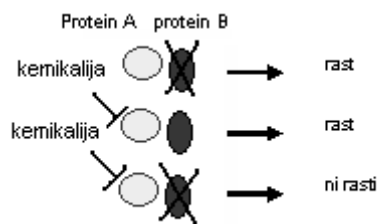
Obstajajo številne poti, s katerimi lahko kemikalija inhibira delitev, rast ali preživetje kvasnih celic. Najpreprostejši mehanizem je inhibicija encima, ki je esencialen za celično rast in delitev, kot je na primer DNA polimeraza (Brenner, 2004). V tem primeru je primarna tarča kemikalije kodirana na esencialnem genu, brez katerega haploidne mutante tudi brez delovanja kemikalije ne rastejo. Rezultati presejalnega testa zbirke delecijских mutant, ki imajo sistematično izbite neesencialne gene, nam tako ne identificirajo direktno tarče testne substance, ampak celične procese, ki so esencialni za rast na tej substanci in s katerimi celica blaži toksični učinek substance (Giaever in sod., 2004; Parsons in sod., 2004, 2006; Brenner, 2004). Zato je za interpretacijo rezultatov presejalnega testa potrebno implementirati vse znane sintetsko-genetske interakcije identificiranih genov (Parsons 2003, 2006). Delecije mutante, ki rastejo relativno hitreje od divjega seva na gojišču s kemikalijo pa nam identificirajo neposredne tarče kemikalije v celici.

Kemikalija z zelo specifično biološko aktivnostjo, kar je pogoj za idealno zdravilo, ima samo eno biološko tarčo in minimalni učinek na ostale procese v celici. Takšna kemikalija bo v kvasni (nemutirani) celici inducirala podoben profil izražanja transkriptoma, kot ga ima mutanta z izbitim ali nefunkcionalnim genom, ki kodira zapis za tarčo te kemikalije (Marton in sod., 1998). Kemijsko-genetski profil kemikalije pa bo identificiral gene, ki imajo sintetsko-genetske interakcije z genom, ki kodira zapis za tarčo te kemikalije (Parsons in sod., 2003). Iz primerjave kemijsko-genetskega profila testne kemikalije in sintetsko-genetskega profila identificiranih genov je mogoče določiti tarče ali procese v celici, na katere ima ta kemikalija največji učinek. Kemijsko-genetski profil za zelo specifične kemikalije vsebuje zato le nekaj genov, katerih produkti so ključni v procesu, na katerega ima ta kemikalija učinek (Parsons in sod., 2004, 2006).

(a) sintetsko genetska interakcija



(b) kemijsko genetska interakcija



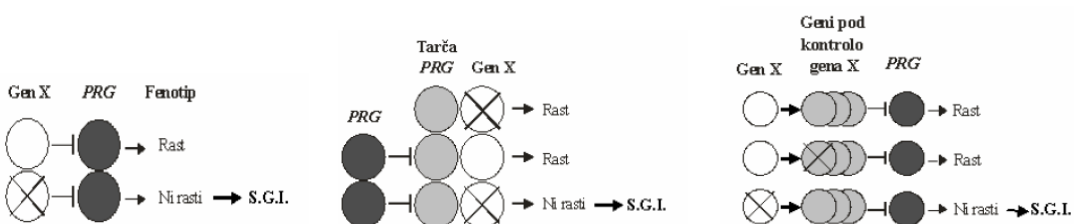
Slika 2.5 Primerjava sintetsko-genetskih in kemijsko-genetskih interakcij

(a) *sintetsko-genetska interakcija* (levo): delecija posameznega gena (na shemi prekržana s črno barvo), ki kodira zapis za protein A oziroma B ne vpliva na rast mutante, dvojne delcije teh dveh hipotetičnih genov, katerih produkti so v interakciji pa je za mutanto usodna (ni rasti).

(b) *kemijsko-genetska interakcija* (desno): delecija mutanta, ki zaradi izbitega gena ni sposobna sintetizirati proteina B (na shemi prekržan s črno barvo), lahko normalno raste brez prisotnosti kemikalije (zgoraj), rast na gojišču z dodano kemikalijo pa je inhibirana, ker je tarča kemikalije (protein A) v sintetski interakciji s proteinom B (spodaj).

(vir: Parson in sod., 2004)

Parsons in sod. (2003, 2004) razlagajo kemijsko-genetske interakcije na modelu sintetsko-genetskih interakcij, kot ja prikazano na **sliki 2.5**. Delecijske mutante, ki so občutljive na testno kemikalijo, so torej v sintetsko-genetski interakciji z biološko tarčo te kemikalije. Petrovič in sod. (2005) navajajo tri osnovne razlage genetskih interakcij med preiskovalnim genom (tarča kemikalije) in nekim drugim genom (X) v genomu kvasovke: (i) gen X lahko inhibira delovanje preiskovanega gena, ki negativno vpliva na rast celice, (ii) gen X je lahko funkcijski homolog esencialnega gena, ki je tarča inhibitornega delovanja preiskovanega gena in (iii) gen X je lahko aktivator skupine genov, ki inhibira delovanje preiskovanega gena, ki negativno vpliva na rast celice. Posamezni primeri teh interakcij so shematsko prikazani na **sliki 2.6**. Rezultati eksperimentov Petroviča in sod. (2005) so pokazali, da v praksi nastopata največkrat zadnje dve možnosti, kar je tudi v skladu z razlago Wagnerja (2000) o razvoju tako velikega števila neesencialnih genov pri kvasovki (poglavje 2.2).



Slika 2.6 Primeri sintetsko-genetskih interakcij

Oznake: S.G.I. – sintetsko-genetska interakcija; PRG - preiskovani gen, katerega produkt v kemijsko-genomski analizi predstavlja tarčo kemikalije v celici

(vir: Petrovič in sod., 2005)

Parsons in sod. (2006) so s kemijsko-genomsko analizo 82 različnih substanc identificirali gene, ki omogočajo odpornost kvasovke na večje število različnih toksičnih molekul. Med drugim so pokazali, da imajo kemikalije s podobnim biološkim učinkom podobne kemijsko-genetske profile. To pomeni, da lahko napovemo molekularni mehanizem delovanja za nove substance, če poznamo mehanizem delovanja za substanco, ki ima enak biološki učinek (Parsons in sod., 2006).

2.3 FENILBUTIRAT (PB) IN FENILACETAT (PA)

Fenilbutirat (4-fenilbutanojska kislina, PB) in fenilacetat (feniletanojska kislina, PA) uvrščamo zaradi njune kemijske strukture z alkilno verigo in aktivno karboksilno skupino v skupino derivatov maščobnih kislin (na **sliki 2.7**), katerih fiziološka vloga v organizmu je: (i) so gradniki fosfolipidov in glikolipidov, sestavnih delov membrane, (ii) sodelujejo pri modifikaciji proteinov, (iii) predstavljajo energijski vir za celice in (iv) derivati maščobnih kislin so udeleženi pri signaliziranju (Stryer, 2000:603).



Slika 2.7 Kemijska zgradba fenilbutirata (levo) in fenilacetata (desno)

PB je bil eden izmed derivatov maščobnih kislin, s katerimi je Franz Knoop v začetku prejšnjega stoletja pojasnil glavno metabolično pot maščobnih kislin v organizmu, ki jo je poimenoval β -oksidacija. Kadar je pse hranil s PB ali drugimi derivati maščobnih kislin s sodim številom ogljikovih atomov vezanih na fenilno skupino, je iz pasjega seča vedno izoliral fenilacetoglicin. Kasnejše študije Websterja in sod. (1976) so pokazale, da je biotransformacija PB v človeku nekoliko drugačna, saj se na PA namesto glicina raje veže glutamin. PB se torej v človeku najprej z β -oksidacijo metabolizira v PA, ta pa se preko acetilacije konjugira v fenilacetoglutamin, ki ga izločajo ledvice (**slika 2.8**). PA je sicer naravna substanca v organizmu, saj je eden izmed metabolitov, ki nastajajo pri katabolizmu aminokislina fenilalanin.

Po molskih razmerjih vsebnosti dušika je fenilacetoglutamin primerljiv s sečnino (oba vsebujeta 2 mola dušika), zato so 1980 začeli uporabljati PA za zdravljenje bolnikov z motnjami ciklusa sečnine. Kasneje so PA zaradi neprijetnega vonja nadomestili s PB, saj se le-ta v organizmu z β -oksidacijo presnavlja v PA (Kasumov in sod., 2004).

Danes se za zdravljenje hiperamonemije, običajno prirojene napake v sintezi sečnine, uporablja natrijev fenilbutirat, ki se trži pod različnimi imeni: triButyrate, Buphenyl (v ZDA) in Ammonaps (v Evropi). Motnje ciklusa sečnine z neonatalnim pojavom so bile pred uporabo zdravila smrtne že v prvem letu življenja, stopnja preživetja pa se je s postavitvijo diagnoze v prvem mesecu življenja in z uporabo PA ali PB povečala na skoraj 80%.

Iz podatkov o zdravilu Ammonaps je razbrati, da je po enkratnem odmerku 5 g zdravila razpolovni čas izločanja PB približno 50 minut, ter da se približno 80-100% zdravila izloči preko ledvic v 24 urah v obliki konjugiranega produkta, fenilacetoglutamina (Evropsko javno poročilo..., 2006). Vendar so rezultati študije Kasumova in sod. (2004) pokazali, da je delež izločenega PB v obliki fenilacetoglutamina veliko manjši, včasih manjši kot 50%. V tej raziskavi so poleg fenilacetoglutamina v človeškem urinu identificirali še druge metabolite PB: fenilbutirilglutamin, nekatere intermediate β -oksidacije ter konjugate le-teh z glukoronidi. Iz primerjave količine PB v začetnem odmerku in količin vseh njegovih identificiranih produktov v urinu, Kasumov in sod. (2004) sklepajo, da se verjetno nekaj PB ali njegovih metabolitov izloči tudi skozi feces, ter da nastajajo v organizmu še drugi, nepoznani metaboliti PB.

V zadnjem času so odkrili še nekatere druge biološke aktivnosti PB (Grzanowski in Needleman, 2002; Liu in sod., 2004): (i) inhibicijo deacetilacije histonov (kromosomskih

proteinov) in s tem vpliv na transkripcijo genov, (ii) delovanje kot kemijski šaperon in (iii) indukcijo proliferacije (rast in delitev) peroksisomov. Zato uporabljajo PB kot testno substanco za klinično zdravljenje različnih bolezni. Ker stimulira transkripcijo gena za fetalni hemoglobin, je učinkovit pri zdravljenju talasemije in bolezni srpastih celic (Kang in sod., 2004; Kasumov in sod., 2004). PB je učinkovit tudi pri zdravljenju adrenolevkodistrofije, ker stimulira produkcijo proteina, ki nadomesti mutirani ATP transporter in s tem prepreči kopičenje maščobnih kislin v celici (Kang in sod., 2004). Raziskave so pokazale pozitivne učinke PB tudi pri zdravljenju cistične fibroze in diabetesa tipa 2 (Kang in sod., 2004). V zadnjem času pa so študije s PB in PA razkrile učinkovitost obeh substanc pri zdravljenju nekaterih vrst raka, obe substanci delujeta *in vitro* kot diferenciacijski agens na različne tipe transformiranih celic in inhibirata njihovo rast (Witzig in sod., 2000; Grzanowski in sod., 2002). Čeprav so predlagali številne razlage o mehanizmih delovanja PB in PA (nekateri so zgoraj navedene), ostaja marsikaj še nerazjasnjeno.

Učinkovitost zdravljenja s PB je velikokrat omejena z njegovo toksičnostjo, kadar je odmerek prevelik. Kasumov in sod. (2004) predpostavljajo, da se pri velikem odmerku PB toksičnost poveča predvsem zaradi večjega deleža nastalih stranskih metabolitov PB, saj je β -oksidacija pri povečani koncentraciji maščobnih kislin manj učinkovita, poleg tega ne smemo zanemariti možnosti, da je kateri izmed še neznanih metabolitov PB ali PA v organizmu močno toksičen.

Za detoksifikacijo in izločanje PA, glavnega metabolita PB, je pri človeku pomembna predvsem faza II biotransformacije, torej konjugacija amino kisline na aromatsko kislino. Konjugacija glutamina ali glicina na aromatsko maščobno kislino je odvisna predvsem od substratne specifičnosti encima, ki katalizira reakcijo vezave amino kisline na aromatsko maščobno kislino (acil-CoA-aminokislinske N-aciltransferaze), in od tipa aromatske maščobne kisline (Webster in sod., 1976). Človek izloča benzoat (pomemben aditiv v prehrani) kot konjugat glicina, fenilacetat pa z glutaminom.

Zaradi različnih funkcij maščobnih kislin v celici je nujno, da je njihov prehod v in iz celice hiter. Hamilton (1998) navaja, da je glavni mehanizem transporta maščobnih kislin pasivni prehod celične membrane z difuzijo, s tako imenovanim flip-flop mehanizmom, in ne preko proteinskih ionskih kanalčkov. S tem modelom transporta maščobnih kislin lahko napovemo, da je transport maščobnih kislin reguliran z njihovim metabolizmom v celici - zaradi katabolnih reakcij maščobnih kislin se njihova koncentracija v celici zmanjša, zato bo difuzija v celico večja (Hamilton, 1998). Ker sta PB in PA derivata maščobnih kislin lahko predpostavimo, da je tudi njun vnos v celico v glavnem preko difuzije.

2.3.1 Metabolizem fenilbutirata in fenilacetata v kvasovki *S. cerevisiae*

Glavni mehanizem razgradnje maščobnih kislin je β -oksidacija, ki v kvasovki poteka izključno v peroksisomih, v višjih organizmih pa tudi v mitohondrijih. Peroksisomi so majhni enomembranski organeli, ki vsebujejo vse encime potrebne za prenos in razgradnjo maščobnih kislin, ter za odstranjevanje produktov, ki nastajajo pri β -oksidaciji. Peroksisomi nimajo svojega genoma kot na primer mitohondriji, zato so vsi peroksisomski proteini kodirani v jedrskem genomu.

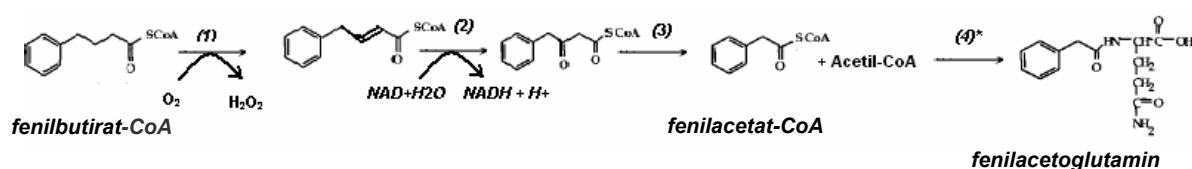
V kvasovki obstajata dve neodvisni poti vnosa maščobnih kislin iz citoplazme v peroksisome: (i) za aktivirane maščobne kisline (vezane na CoA) preko ABC transportnih proteinov na membrani peroksisoma in (ii) za proste maščobne kisline z

difuzijo, njihov vnos v peroksisom je pogojen z aktivnostjo peroksisomske acil-CoA sintetaze (van Roermund in sod., 2004).

β -oksidacija maščobnih kislin v kvasovki poteka po enakih stopnjah kot v človeku (**slika 2.8**), posamezne stopnje pa katalizirajo homologni encimi (van Roermund in sod., 2003). Najprej se maščobne kisline aktivirajo z vezavo na CoA, nato sledi sklop ponavljajočih se reakcij, ki pri oksidaciji PB potečejo le enkrat: (i) oksidacija enojne vezi med dvema ogljikovima atoma do dvojne vezi, (ii) adicija vode na dvojno vez z uvedbo hidroksilne skupine na enega od ogljikov, (iii) oksidacija te hidroksilne skupine in (iv) razcep vezi C-C. Na sliki 2.8 so prikazani nekateri metaboliti, ki nastajajo v β -oksidaciji PB, ter njegova glavna končna produkta v človeku PA in fenilacetoglutamin. V literaturi nismo dobili podatkov, če se PA izloča iz kvasovke v obliki konjugiranega produkta s katero AK.

Za kvasovke je značilno, da so rezistentne na številne šibke kisline, med drugim tudi na sorbinsko kislino in benzoat, ki sta pomembna aditiva v prehrabeni industriji, kar je večkrat vzrok za neučinkovito konzerviranje prehrabnih izdelkov (Kren in sod., 2003). Rezistenco omogoča kvasovki membranski ABC transporter Pdr12p, ki črpa anione šibkih kislin iz celice. Študije sevov kvasovke z nefunkcionalnim *PDR12* genom, so namreč pokazale povečano občutljivost kvasnih celic na šibke kisline (Bauer in sod., 2003). Ker sta PB in PA šibki kislini, lahko predpostavimo, da je za njuno izločanje iz celice tudi pomemben aktiven transport s pomočjo Pdr12p.

β -oksidacija PB v kvasovki (van Roermund in sod., 2003): iz ene molekule PB nastane poleg PA še molekula acetiliranega CoA, ki potuje iz peroksisoma do mitohondrija, kjer se popolno oksidira do CO_2 in H_2O . Vodikov peroksid, ki je stranski produkt prve stopnje β -oksidacije, razgrajuje katalaza (Cta1p) do H_2O in O_2 . V regeneracijo NAD^+ v peroksisomih kvasovke naj bi bile vključene malat dehidrogenaze Mdh1p, Mdh2p in Mdh3p. Glede na eksperimentalne podatke so v sam proces β -oksidacije neposredno vključeni encimi Fox1p, Fox2p in Fox3p.



Slika 2.8 Reakcije β -oksidacije PB: na shemi so prikazani posamezni intermedieati v β -oksidaciji, s številkami so označeni encimi, ki katalizirajo posamezne stopnje β -oksidacije v kvasovki *S. cerevisiae* (van Roermund in sod., 2003): (1) acil-CoA sintetaza (Fox1p), (2) multifunkcijski encim z dehidrogenazno in hidratazno aktivnostjo (Fox2p), (3) 3-ketoacil-CoA tiolaza (Fox3p); (4)* ta stopnja poteka v človeku, nimamo pa podatkov, če se tudi v kvasovki veže glutamin ali katera druga amino kislina na PA.

O metabolizmu PB ter o mehanizmu delovanja PB in/ali njegovih metabolitov na kvasne celice je še veliko neznanega. Genetske analize so razkrile, da PB v kvasovki inhibira privzem aminokislina triptofan iz okolja (Grzanowski in Needleman, 2002; Liu in sod., 2004), ter da je njegov učinek na kvasne celice podoben substanci FK506 – imunosupresorju, ki se v medicini uporablja za zmanjšanje imunskega odziva pri transplantacijah (Grzanowski in Needleman, 2002). Tako PB kot njegov metabolit PA sta šibki kislini ($\text{pKa}(\text{PB})=4,7$ in $\text{pKa}(\text{PA})=4,3$) in v celici povzročita zakisanje citoplazme (Liu in sod., 2004). Celično membrano namreč prehajata večinoma v neionizirani obliki, zato se v citoplazmi ionizirata in pri tem oddata proton. Zakisanje

celice inducira stresni odgovor kvasovke, ki se kaže predvsem v ekspresiji genov, ki kodirajo membranske črpalke za transport nastalih anionov in protonov iz celice (Liu in sod., 2004). Rezultati raziskave Liu in sod. (2004) so pokazali, da se PB veže na nekatere membranske receptorje, kar je lahko tudi ena izmed razlag njegovega učinkovitega zdravljenja tumorskih celic. PA naj bi med drugim inhibiral celično delitev tumorskih celic tudi preko majhnih transportnih Ras proteinov (Braga-Basaria in Ringel, 2003). Vse raziskave mehanizmov delovanja PB in PA kažejo na nespecifični učinek obeh substanc na celice, kar pomeni, da imata obe substanci veliko celičnih tarč, ki pa niso še vse identificirane.

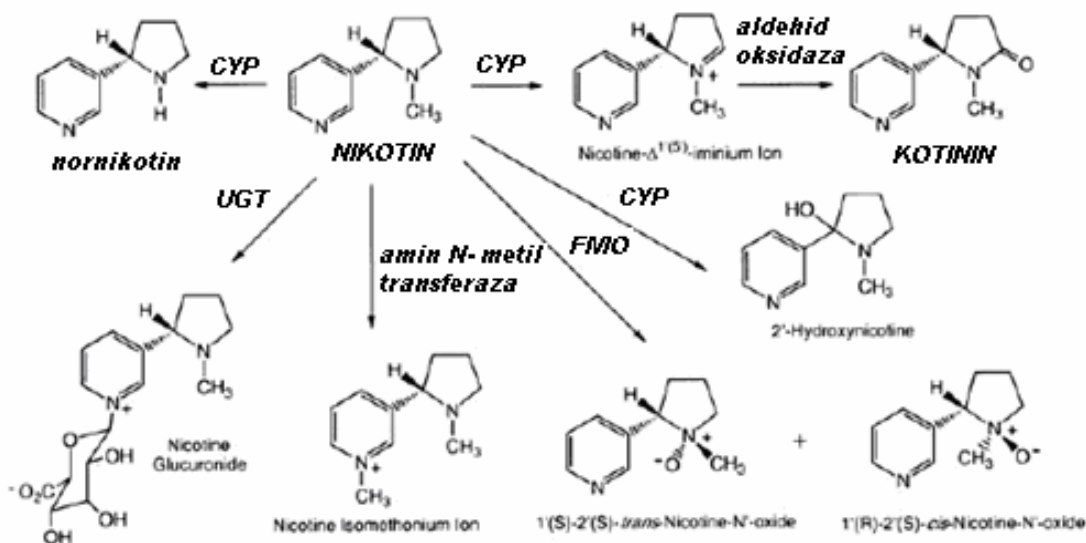
2.4 NIKOTIN

Nikotin ((S)-3-(1-metil-2-pirolidin)piridin) je alkaloid, ki v majhnih količinah nastaja v številnih rastlinah: jajčevcih, krompirju, paradižniku... (Hukkannen in sod., 2005), največ pa ga je v rastlinah *Nicotiana tobacum* in *Nicotiana rustica*, katerih listi se posušeni uporabljajo večinoma za kajenje. Tobakovec je v Evropo prinesel Krištof Kolumb in se je prvotno, zaradi pomirjevalnega učinka, uporabljal kot zdravilo. Danes je tobak med najbolj uporabljenimi drogami tako po svetu, kot tudi v Sloveniji, za njegov »uspeh« pa je kriv predvsem nikotin. Njegovo dvojno pomirjevalno in poživiljajoče delovanje namreč zagotavlja poseben občutek ugodja in hkrati ob daljši uporabi povzroči zasvojenost, zaradi katere marsikateri kadilec ne more prenehati kaditi (Hukkannen in sod., 2005). Nikotin se zato uporablja kot aktivna substanca v različnih farmakoloških sredstvih (žvečilni gumi, tablete, razpršila, obliži), ki naj bi bile v pomoč pri odvajanju od kajenja (Quik, 2004; Tutka in sod., 2005). Uporaba tobaka v katerikoli obliki – cigaret, cigar, pip, žvečenje, njuhanje, pa tudi izpostavljenost produktom izgorevanja tobaka s pasivnim kajenjem, pomembno pripomore k obolevnosti in smrtnosti zaradi kardiovaskularnih in pljučnih bolezni, ter karcinoma (Tutka in sod., 2005). Raba tobaka predstavlja velik zdravstveni problem tudi v deželah v razvoju, kjer je glavni krivec za prezgodnjo smrtnost (Hukkannen in sod., 2005). Tobak vsebuje preko 4000 različnih substanc, številne med njimi so zelo toksične (Quik, 2004), zato nikotin ni edini krivec za toksični učinek tobaka, je pa glavni krivec za njegovo množično rabo, prav zaradi odvisnosti, ki jo povzroča (Hukkannen in sod., 2005).

Novejše epidemiološke raziskave so razkrile, da imajo kadilci manjšo incidenco za Parkinsonovo in Alzheimerjevo boleznijo kot nekadilci (Quik, 2004). Quik (2004) v njeni študiji navaja, da je nikotin ena izmed najpomembnejših substanc v tobaku, ki lajša nevrološke motnje povezane s tema razmeroma pogostima boleznima. Rezultati analiz farmakološkega delovanja in metabolizma nikotina bi zato lahko veliko prispevali k sintezi novih, učinkovitih zdravil za omenjeni bolezni (Hukkannen in sod., 2005). Nikotin je uporabna testna kemikalija tudi pri študijah citokromov P450 - encimov, ki imajo pomembno vlogo v procesu razstrupljanja organizmov, ker stimulira njihovo sintezo (Quik, 2004; Hukkannen in sod., 2005).

Nikotin je po kemijski sestavi terciarni amin, sestavljen iz piridinskega in N-metil pirolidinskega obroča (**slika 2.9**). Z eksperimenti so identificirali kar šest produktov prve stopnje biotransformacije nikotina v sesalcih (Hukkannen in sod., 2005), velik delež letih se dodatno transformira še v drugi fazi biotransformacije. Metabolizem nikotina, ki v človeku večinoma poteka v jetrih, je zelo kompleksen proces, v katerega je vključenih več encimov in v katerem nastajajo številni metaboliti, nekateri med njimi so tudi toksični (Hukkannen in sod., 2005).

Kar 70-80% nikotina v človeškem organizmu se biotransformira s C-oksidacijo (faza I biotransformacije) v kotinin (Hukkannen in sod., 2005). Biotransformacija nikotina do kotinina poteka v dveh stopnjah (**slika 2.9**), v katerih sta vključena encima CYP2B6 (citokrom P450) in aldehyd oksidaza (Tutka in sod., 2005). Poleg C-oksidacije so v fazi I biotransformacije nikotina pomembne še: (i) reakcija N-oksidacije, ki jo katalizira flavin monooksigenaza (FMO), nastane nikotin N-oxid; (ii) N-demetilacija in (iii) adicija hidroksilne skupine (Tutka in sod., 2005; Hecht in sod., 2000). V fazi II biotransformacije nikotina v glavnem poteka konjugacija glukuronida s pomočjo encima UGT - glukuronozil-transferaze (Nicotine: pharmacokinetics..., 2005), del nikotina in njegovih metabolitov iz I faze biotransformacije pa se metilizira z encimom amin N-metiltransferazo (Tutka in sod., 2005, Hukkannen in sod., 2005).



Slika 2.9 Nekaterne stopnje biotransformacije nikotina v človeku (vir: Hukkannen in sod., 2005)

Poti vnosa nikotina v organizem so lahko preko kože, z zaužitjem ali preko pljuč. Nikotin je šibka baza ($pK_a=8$), zato je njegova absorpcija odvisna od pH medija (Hukkannen in sod., 2005). Ker je površina pljuč zelo velika, se nikotin s kajenjem hitro absorbira tudi v nevtralnem pH in njegova koncentracija v krvi naraste kmalu po kajenju, ter se razporedi v različna tkiva: možgane, jetra, skeletne mišice, ledvice in črevesje (Hukkannen in sod., 2005). Nikotin, ki je vnesen z zaužitjem, se večinoma absorbira v tankem črevesju, predvsem zaradi bazičnega pH in velike absorpcijske površine tankega črevesja. Nikotin lahko prehaja tudi dermalno zaščitno plast, kar je vzrok za številne zastrupitve delavcev na plantažah tobaka in s pesticidi na osnovi nikotina (Nicotine: pharmacokinetics..., 2005).

Znana tarča nikotina v višje razvitih organizmih je nikotinski acetilholinski receptor: nikotin se veže namesto acetilholina na aktivno mesto receptorja, kar povzroči odprtje ionskega kanalčka in povečano propustnost za Na^+ in K^+ ione (Quik, 2004). Zaradi nevrotoksičnega učinka so nikotin že v 18. stoletju uporabljali kot insekticid (Hodgson in Levi, 1997:257), v današnjem času so ga nadomestili neonikotinoidi, ker so manj toksični za človeka. Raziskave farmakodinamike nikotina v sesalcih so razkrile, da ima nikotin, poleg vezave na nikotinski acetilholinski receptor, učinek tudi na nekatere druge procese v celici: (i) inducira sintezo encimov, ki so pomembni pri detoksifikaciji

celice (FMO in nekatere encime iz skupine citokroma P450); (ii) inhibira kompleks I (NADH-dehidrogenazo) v prenašalni verigi elektronov in (iii) nikotin lahko deluje v celici tudi kot antioksidant (Quik, 2004). Lang in sod. (2003) so v študiji inhibicije analogov nukleozidov pokazali, da ima nikotin veliko afiniteto do pirimidin-nukleozidnih transporterjev.

Letalna doza (LD) nikotina za odraslega človeka je ocenjena na 30-60 mg, za otroke pa 10 mg nikotina, oralna LD50 (doza, ki povzroči smrt 50% osebkom) je za psa 9,2 mg/kg, za podgano pa 50 mg/kg (de Landoni. Nicotine..., 1991). V eni cigareti je v povprečju 8 mg nikotina, od tega absorbira kadilec v telo okrog 3 mg, dnevna doza kadilca, ki pokadi 20 cigaret je tako okrog 60 mg nikotina, kolikor je letalna doza za odraslega človeka (Nicotine: pharmacokinetics..., 2005). Zato je ključnega pomena njegovo izločanje iz telesa.

Nikotin je lipofilna substanca ($pK_w=1,2$), zato je za njegovo izločanje pomembna biotransformacija, ki v človeku večinoma poteka v jetrih. Nastali metaboliti, kot tudi nikotin, pa se iz organizma večinoma izločijo z urinom (Nicotine: pharmacokinetics..., 2005). Pri izločanju nikotina iz celice je poleg difuzije pomemben tudi aktiven transport (Fukada in sod., 2002). Razpolovni čas izločanja nikotina je okrog 2 h, kotinina pa okrog 17 h (Tutka in sod., 2005).

In vivo študije metabolizma nikotina v živalih in človeku so razkrile, da obstaja velika variabilnost v metabolizmu med vrstami in tudi znotraj vrste (Tutka in sod., 2005). Metabolizem nikotina v sesalcih je predmet številnih raziskav, s katerimi so identificirali že številne metabolite in tarče nikotina v organizmu, vendar je še marsikaj v metabolizmu nikotina ostalo nepojasnjenega. Prav tako je še veliko neznanega o bioloških učinkih in toksičnosti znanih metabolitov nikotina, na primer kotinina (Quik, 2004).

Čeprav smo o farmakokinetiki in farmakodinamiki nikotina v sesalcih dobili veliko literature, pa o vlogi nikotina v kvasovki nismo dobili veliko informacij. Tako nam ni poznan metabolizem nikotina v kvasni celici in njegov toksični učinek, prav tako so nam nepoznane celične tarče delovanja ter encimi, ki so vključeni v detoksifikacijo nikotina v kvasovki. Edine informacije o farmakodinamiki nikotina v kvasni celici smo dobili iz študije Goossensa in sod. (2003), kjer so proučevali izločanje alkaloidov iz kvasnih celic s pomočjo ABC transporterjev. V eksperimentu so testirali občutljivost delecijjskih mutant s sistematično izbitim genom, ki kodira zapis za enega izmed šestih testiranih ABC transporterjev, na različne rastlinske alkaloidne, med njimi tudi na nikotin. Rezultati eksperimenta so pokazali, da imajo ti transporterji pomembno vlogo pri prenosu alkaloidov iz celice in s tem v razstrupljanju celice. Rezultati za nikotin sicer niso bili povsem jasni, saj od testiranih transporterjev ni nobeden izkazoval pomembne vloge pri aktivnem transportu nikotina iz celice.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

agar.....	Sigma, ZDA
D-(+)-Glukoza	Fluka, Nemčija
EtOH, 96%.....	Carlo Erba, Italija
kvasni ekstrakt.....	Sigma, ZDA
pepton.....	Sigma, ZDA
fenilacetna kislina, 99%	Fluka, Nemčija
natrijev hidroksid.....	Merck, Nemčija
4-Fenilbutanojska kislina, >99%	Fluka, Nemčija
nikotin, 99%	Fluka, Nemčija
deionizirana voda (dH ₂ O)	

3.1.2 Pribor in drobna oprema

pravokotne sterilne petrijevke, OmniTray	Nalge Nunc International, ZDA
ročni replikator s 384 konicami (VP386)	V&P Scientific, ZDA
okvir za poravnavo plošč (VP380).....	V&P Scientific, ZDA
avtomatske pipete: P-2, P-20, P-200, P-1000	Gilson, Francija
nastavki za pipete 1000µl (modri).....	Sarstedt, Nemčija
nastavki za pipete 200µl (rumene)	Sarstedt, Nemčija
0,2 µm sterilni filtri.....	Sartorius AG, ZDA
pipetor (accu- jet pro).....	BrandTech, ZDA
gorilec- Labogaz 206	Campingaz, Francija
kartuše za gorilec Oxiturbo	Campingaz, Francija
mikrocentrifugirke, 1,5ml.....	Sarstedt, Nemčija
platinasta cepilna zanka.....	Zlatarna Celje
plastični, sterilni nastavki za pipetor za enkratno rabo	
magneti	
injekcijske brizge	
stojalo za epruvete	
stojalo za mikrocentrifugirke	
steklovina: valji, erlenmajerice, petrijevke, epruvete	
alu folija	

3.1.3 Laboratorijska oprema

Avtoklav	Varioclav (Labortechnik), Nemčija
Fotoaparat Olympus FE-100	Olympus Europa, Nemčija
Hladilnik (4°C).....	Gorenje, Slovenija
Tehtnica, PC2000	Mettler, Švica
Električni stresalnik Vibromix 202 EV	Tehtnica, Slovenija
Magnetno mešalo, Monotherm	Variomag, ZDA

Magnetno mešalo, MM-531 Tehnica, Slovenija
 Inkubator-suhi, Certomat HK B.Braun Melsunger, Nemčija
 Inkubator-suhi s stresalnikom C25 New Brunswick Scientific, ZDA
 Stresalnik, Centomat R..... B.Braun Melsunger, Nemčija
 Invertni mikroskop Olympus IX71 Olympus
 Neubauerjeva števna komora (hemocitometer) Brand, Nemčija
 Sušilec za lase

3.1.4 Gojišča

Sestavine za YPD («Yeast Peptone Dextrose») gojišče:

- kvasni ekstrakt 10g
- pepton 20g
- D-glukoza 20g
- Agar 20g- za trdno gojišče
- dH₂O do 1l

Vse sestavine smo odtehtali v primerno veliko erlenmajerico, dolili dH₂O in dali na magnetno mešalo, da so se raztopile, nato smo pokrili z alu folijo in medij sterilizirali z avtoklaviranjem. Trdna gojišča smo pripravili tako, da smo medij po avtoklaviranju ohladili z mešanjem na magnetnem mešalu na približno 60°C in ga nato vlili v sterilne petrijevke.

Za pripravo YPD gojišč s testno substanco (PB, PA ali nikotina), smo po ohlajanju na približno 60°C, v medij sterilno odpipetirali ustrezeni volumen izbrane substance, premešali z magnetnim mešalom in vlili v sterilne petrijevke.

Sterilni 1M PB oziroma PA smo pripravili iz fenilacetne oziroma fenilbutanojske kisline in natrijevega hidroksida v dH₂O v 1M koncentraciji ter sterilizirali z 0,2 µm sterilnim filtrom. Tako pripravljeno raztopino smo uporabljali za pripravo trdnih gojišč z izbrano koncentracijo PB oziroma PA.

YPD gojišče je neselektivno gojišče, bogato z amino kislinami, vitamini in minerali, ki jih kvasovke potrebujejo za oksidativno ali fermentativno rast. Vsi nutrienti v gojišču so v ustreznih razmerjih, tako da nobeden izmed njih ni limitirajoči faktor rasti.

3.1.5 Uporabljeni sevi kvasovke *S.cerevisiae*

Divji tip (WT, angl. »wild type«) *S. cerevisiae*: sev BY4742, haploid z genotipom: *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *lys2Δ0*; *ura3Δ0*

YKO («Yeast Knock-Out») zbirka - zbirka delecijjskih mutant *S. cerevisiae*: Sevi so haploidi serije BY4741 z genotipom: *MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *xxxΔ::Kan^r*- posamezni geni so sistematično izbiti in zamenjani s kaseto za kanamicinsko rezistenco. Zbirka je opisana v poglavju 2.2.1.

3.2 METODE IN POSTOPKI

3.2.1 Gojenje kvasnih celic

- trdna gojišča: v inkubatorju pri 30°C
- tekoča gojišča: v inkubatorju pri 30°C in na stresalniku pri 250 obratov/minuto

Čas inkubacije je različen in odvisen od uporabljene metode. Dejanski čas inkubacije je naveden ob posameznih rezultatih.

3.2.2 Aseptična tehnika dela

Vse eksperimente smo izvajali aseptično, ob plamenu. Pred delom smo najprej delovno površino razkužili z etanolom. Ves mikrobiološki material (steklovino, cepilno zanko...) smo pred uporabo ožgali nad plamenom in eksperiment izvajali v aseptičnem območju, v bližini plamena gorilnika.

3.2.3 Določanje inhibitornih koncentracije PB, PA in nikotina za rast kvasovke *S. cerevisiae*

3.2.3.1 Izbrani sevi za določanje inhibitorne koncentracije

Za določitev inhibitorne koncentracije PB, PA in nikotina smo uporabili tri seve kvasovke *S. cerevisiae*: divji tip (BY4742), mutanti *pdr5Δ* in *pfk2Δ* iz YKO zbirke.

Pdr5p je kot transporter ksenobiotikov iz celice pomemben pri razstrupljanju celice in spada v skupino MRP proteinov, ki omogočajo odpornost organizma na večje število različnih toksičnih molekul (Parsons in sod., 2004). Mutanta *pdr5Δ* je tako zelo občutljiva na številne kemikalije, zato smo ta sev izbrali za določanje inhibitornih koncentracij naših testnih substanc.

Pfk2p je vključen v proces glikolize in je ključen za anaerobno rast. Nikotin naj bi med drugim pri človeku blokiral kompleks I v mitohondrijski transportni verigi elektronov (Quik, 2004) in ob predpostavki, da ima podoben efekt tudi na dihalno verigo pri kvasovki, bi morala mutanta *pfk2Δ* slabše rasti v prisotnosti nikotina. Izbitje *PFK2* namreč preprečuje fermentativno rast, nikotin pa naj bi oslabil oksidativno. Ta sev je bil torej izbran predvsem za določanje inhibitorne koncentracije nikotina, da bi test poenotili pa smo za vse tri testne substance uporabili iste seve.

3.2.3.2 Priprava gojišč s testnimi koncentracijami PB, PA in nikotina

Gojišča z dodanim PB, PA in nikotinom smo pripravili, kot je opisano pod točko 3.1.4.

Za določitev inhibitorne koncentracije PB in PA smo testirali gojišča z 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM in 100 mM koncentracijami PB oziroma PA. Za določitev inhibitorne koncentracije nikotina smo pripravili gojišča z 0,1 mM, 1 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM in 100 mM nikotinom.

3.2.3.3 Postopek

V epruvete smo prenesli po 2 ml tekočega YPD, nato s cepilno zanko nacepili izbrane seve ter inkubirali preko noči. 10 µl homogene prekončne kulture smo prenesli v 2 ml svežega medija in inkubirali do eksponentne faze rasti kvasnih celic (približno 5h), kar smo ocenili vizualno kot povečano motnost medija. Celice smo nato prešteli pod mikroskopom z Neubauerjevo števno komoro in tako določili gostoto celic v mediju. Na hemocitometer smo dali po 8 µl homogene kulture, ter pod mikroskopom prešteli celice v manjših kvadratih števne komore. Ker je štetje celic zamudno, smo prešteli celice le v štirih kvadratih, saj so bile kvasovke v eksponentni fazi rasti in je bila tako napaka zaradi štetja manjša, kot bi bila zaradi rasti celic v času štetja. Gostoto celic (N) smo izračunali po formuli (3) - povprečno število celic v majhnem kvadratu (\bar{a}) smo delili z znanim volumnom tega vgraviranega kvadrata ($1/4 \cdot 10^{-6}$ ml):

$$N = \bar{a} \times 4 \times 10^6 \text{ [celic/ml]} \quad (3)$$

Kulture sevov z znano gostoto celic smo ustrezno redčili s tekočim YPD gojiščem na gostoto 10^6 celic/ml. Iz tako razredčene kulture smo pripravili še redčine z gostoto 10^5 , 10^4 , 10^3 in 10^2 celic/ml tako, da smo v 900 µl dH₂O dodali 100 µl homogene kulture z 10-krat večjo gostoto od zelene gostote. Vse redčine smo pripravili v mikrocentrifugirkih in pred vsakim prenosom kulture dobro premešali, da so bile homogene. Po 3 µl redčin kulture vseh treh sevov smo prenesli na trdna gojišča z različnimi koncentracijami testne substance in na kontrolno gojišče, brez testne substance (samo YPD) ter inkubirali 24h. Po končani inkubaciji smo vsa gojišča fotografirali.

Kot ustrezno inhibitorno koncentracijo smo izbrali tisto najnižjo koncentracijo, pri kateri je bila vizualno očitna manjša rast seva divjega tipa v primerjavi z rastjo tega seva na kontrolnem gojišču.

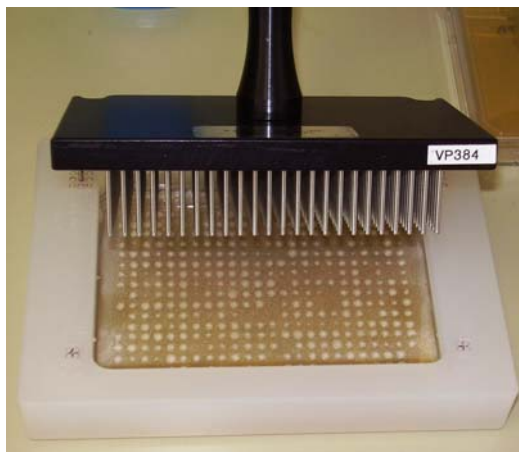
3.2.4 Presejalni test: kemijsko-genomska analiza

Predhodno smo pripravili trdna gojišča v pravokotnih petrijevkah: 16 YPD gojišč z dodano testno substanco v predhodno določeni ustrezni inhibitorni koncentraciji ter 16 YPD gojišč brez testne substance (kontrolne). Postopek priprave gojišč je opisan pod točko 3.1.4. Gojišča s PB in PA smo pripravili v isti koncentraciji (inhibitorna za PB), da bi lahko primerjali vpliv iste koncentracije obeh substanc na rast mutant.

Zbirka haploidnih delecijских mutant je bila prenesena ročno, s pomočjo ročnega replikatorja in okvirja za poravnavo plošč, kot prikazuje **slika 3.1**.

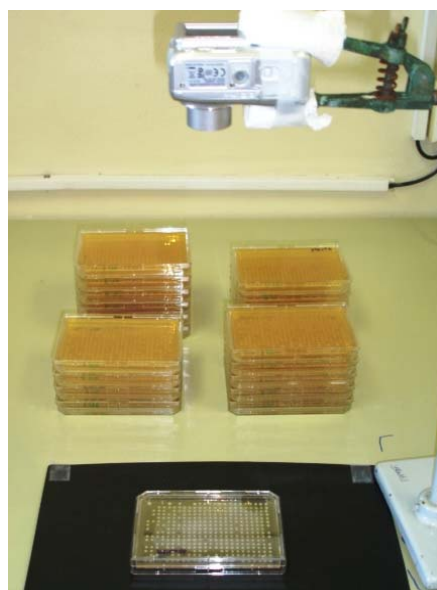
Pri prenosu sevov iz YKO zbirke na testno gojišče smo bili pazljivi na sledeče:

- vse plošče so bile enako obrnjene in sicer tako, da sta bila odsekana roba plošče na vrhu, kot je prikazano na **sliki 2.3(b)**,
- stranska zobca replikatorja smo dali v srednji luknji na zgornjem delu okvirja za poravnavo plošč,
- pred odtisom smo preverili, če se plošča lepo prilega okvirju za poravnavo plošč,
- replikator smo narahlo odtisnili na agarno gojišče in pri tem pazili, da ga nismo prebodli.



Slika 3.1 Ročni replikator in okvir za poravnavo plošč: omogočata natančen prenos 384-ih sevov iz trdnega gojišča

Pred vsakim prenosom smo replikator temeljito očistili: najprej v dH_2O , ki smo ji dodali čistilo za laboratorijsko posodo in opremo, nato v čisti dH_2O , nazadnje smo replikator očistili še s 96% etanolom in ga s pomočjo sušilca za lase temeljito posušili. Pred odtisom smo replikator sterilizirali tako, da smo replikatorske vilice namočili v 96% etanolu in jih za nekaj sekund pridržali nad plamenom, da je etanol zgorel. Počakali smo približno 1 minuto, da so se replikatorske vilice ohladile in nato pričeli s prenosom. Vse plošče smo replicirali tako, da smo najprej iz plošče YKO zbirke prenesli seve s pomočjo replikatorja na ploščo s testno substanco in nato odtisnili replikator še na kontrolni plošči, brez testne substance (YPD). Ko smo tako prenesli vseh 16 plošč iz YKO zbirke, smo testne in kontrolne plošče inkubirali 48h. Za mutante, ki so rasle na gojiščih z dodanim PB, smo čas inkubacije podaljšali na 6 dni, ker so rasle zelo počasi. Pregled rasti smo opravili vsakih 24h inkubacije, torej je bil celoten pregled opravljen 2-krat za 48h inkubacijo, za test s PB-jem pa šestkrat. Vse rezultate smo razvrstili v pet kategorij, ki so opisane v poglavju 4.3. Vsa gojišča smo po končani inkubaciji fotografirali (**slika 3.2**).



Slika 3.2 Fotografiranje gojišč po končani inkubaciji

3.2.5 Test z redčinami na agarnih ploščah

Test z redčinami smo naredili za 27 delecijskih mutant iz YKO zbirke in za sev divjega tipa (WT).

Za test z redčinami smo pripravili gojišča z 10 mM koncentracijo PB, 100 oziroma 40 mM koncentracijo PA, ter kontrolna (samo YPD) gojišča. Postopek priprave gojišč je opisan v poglavju 3.1.4.

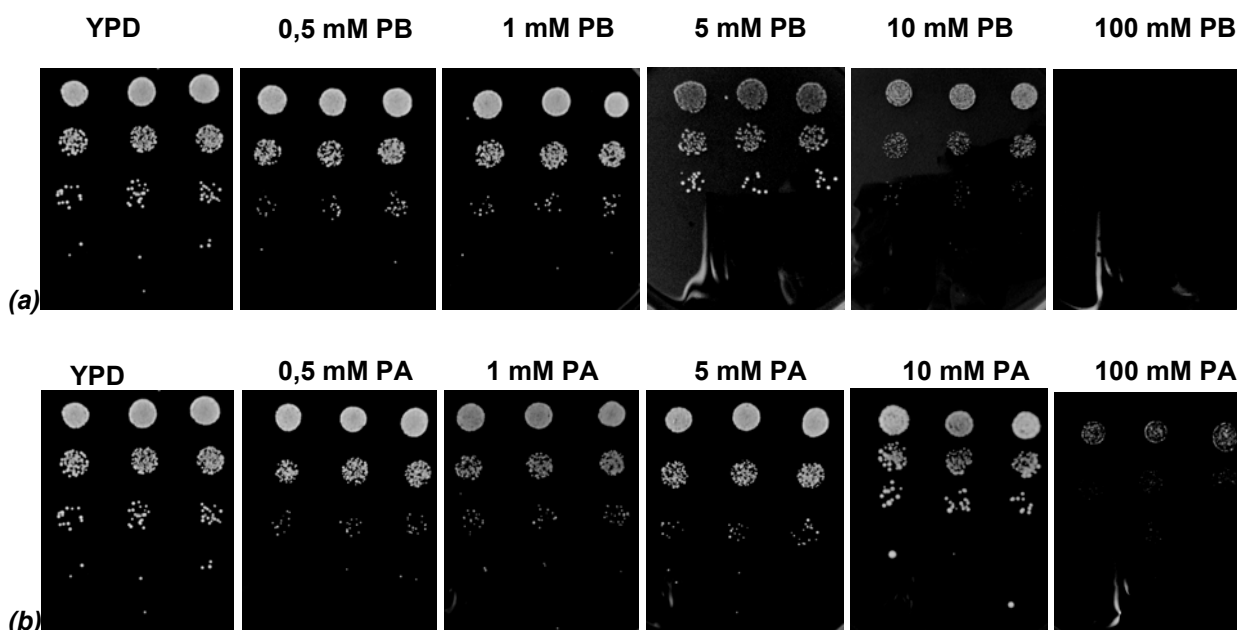
Izbrane seve smo s cepilno zanko prenesli v 2 ml tekočega YPD in inkubirali preko noči. Prekonočne kulture smo dali v svež medij in počakali, da so celice prišle v eksponentno fazo rasti, nato smo jim določili gostoto – postopek je opisan pod točko 3.2.2.3. Kulture znane gostote smo nato redčili, najprej na gostoto 10^6 celic/ml v tekočem YPD. Iz teh redčitev smo pripravili še serijo štirih 10-kratnih redčitev v dH_2O tako, da smo v mikrocentrifugirko z 900 μ l dH_2O dodali 100 μ l kulture s 10-krat večjo gostoto. Kulture smo pred vsakim prenosom dobro premešali, da so bile homogene. Po 3 μ l tako pripravljenih redčin vseh izbranih sevov smo nanесли na pripravljena gojišča z dodanim PB, PA in na kontrolna gojišča. Na vsako gojišče smo poleg testnih sevov mutant nanесли serijo redčin divjega seva.

Tako pripravljene plošče smo inkubirali 48h, gojišča z dodanim PB pa 6 dni. Vsakih 24h smo pregledali rast sevov tako, da smo primerjali rast redčin posameznega seva na vseh treh gojiščih (PB, PA in YPD) in istočasno primerjali tudi rast redčin tega seva z rastjo redčin divjega tipa (WT) na vsakem gojišču. Po končani inkubaciji smo vsa gojišča fotografirali (**slika 3.2**).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 INHIBITORNE KONCENTRACIJE PB IN PA

Predhodne študije so pokazale, da PB zavira rast kvasovke *S. cerevisiae* (Grzanowski in Needleman, 2002; Liu in sod., 2004), kar je pogoj za kemijsko-genomsko analizo z uporabo kvasovk kot modelnega organizma. Ker nas je zanimala primerjava vplivov PB in PA na kvasovko, smo za določanje inhibitorne koncentracije PA in PB pripravili gojišča z enakimi koncentracijami obeh substanc. Za določitev inhibitorne koncentracije smo testirali rast izbranih sevov na bogatih (YPD) gojiščih s pH vrednostjo med 5,5 in 6 in z dodanim PB oziroma PA v končnih koncentracijah 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM in 100 mM (**slika 4.1**). Za določitev inhibitorne koncentracije PB in PA smo primerjali velikosti kolonij sevov *pdr5Δ*, *pfk2Δ* in divjega tipa (BY4742) na gojiščih z dodano testno koncentracijo PB oziroma PA in na kontrolnem YPD gojišču (brez kemikalije) po 24h inkubacije. Iz **slike 4.1** lahko vidimo, da so vsi trije sevi enako občutljivi na PB in PA, čeprav smo pričakovali, da bo sev *pdr5Δ* rasel počasneje na gojiščih z dodano kemikalijo. Pdr5p je namreč ABC transporter, lociran na plazemski membrani in spada v družino MRP proteinov, ki omogočajo odpornost kvasovki na večje število različnih toksičnih substanc. S hidrolizo ATP omogoča aktivni transport steroidov, kationov in nekaterih toksinov iz celice, zato so sevi z nefunkcionalnim *PDR5* genom občutljivi na številne kemikalije (Parsons in sod., 2004). Rezultati našega eksperimenta kažejo na to, da Pdr5p nima pomembne funkcije pri transportu PB, PA ali njunih metabolitov iz celice.



Slika 4.1 Velikost kolonij na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami PB ali PA: testirani sevi (na plošči od leve proti desni) so *pdr5Δ*, *pfk2Δ* in divji tip (BY4742). Na posamezni plošči so zgoraj nanesene redčine izbranih sevov z največjo gostoto celic (10^6 celic/ml), sledijo redčine z nižjo gostoto, spodaj so tako redčine z najnižjo gostoto (10^2 celic/ml).

(a) PB inhibira rast kvasnih celic v koncentracijah od 5-10 mM, na gojišču s 100 mM PB sevi niso zrasli;

(b) PA inhibira rast kvasnih celic izmed testnih koncentracij šele pri 100 mM koncentraciji.

Inhibitorna koncentracija PB za kvasne celice je odvisna tako od sestave gojišča, kot od pH vrednosti gojišča, kar kažejo tudi rezultati nekaterih študij vpliva PB na kvasne celice. Grzanowski in Needleman (2002) sta z merjenjem optične gostote kvasnih celic v medijih z različnimi koncentracijami PB pokazala, da PB inhibira rast kvasnih celic v koncentracijah od 0,1 do 1 mM v tekočem, minimalnem gojišču (z virom dušika brez amino kislin, pri pH od 5 do 6). Liu in sod. (2004) so za proučevanje vpliva PB na transport amino kislin uporabljali 1 – 3 mM koncentracije PB v bogatem (YPD) gojišču s pH 5 in dodanim pufrom. Te koncentracije PB so primerljive s plazemskimi koncentracijami, ki nastanejo pri humanem zdravljenju s PB, in še nimajo toksičnega učinka na človeka (Lui in sod., 2004). Kang in sod. (2001) so testirali vpliv različnih koncentracij PB na mušico *Drosophila* in z eksperimenti dokazali, da ima 10 mM koncentracija PB največji, še netoksični učinek na mušice, ki se je kazal v spremenjenem izražanju nekaterih genov in daljši življenjski dobi mušice. Iz omenjene raziskave z mušicami je tudi razvidno, da PB pri koncentracijah nižjih od 10 mM ni imel opaznega učinka na mušice, višje koncentracije pa so imele na mušico toksičen učinek. Učinek PB na rast kvasovk je prav tako pogojen s koncentracijo PB v mediju in lahko začasno inhibira ali takoj ustavi rast kvasnih celic. Grzanowski in Needleman (2002) sta pokazala, da je rast kvasovk pri 1 mM koncentraciji PB (v minimalnem mediju, pH 5,8) takoj ustavljena, vendar so kvasovke po 24h še vedno žive. V literaturi ni veliko podatkov o inhibitornih koncentracijah PA za rast kvasnih celic. Iz študije Lui in sod. (2004) smo dobili le podatek, da 6 mM koncentracija PA v bogatem gojišču (pri pH 5) ne inhibira rasti kvasnih celic.

Rezultati naših eksperimentov kažejo (**slika 4.1(a)**), da je rast kvasnih celic na bogatem (YPD) gojišču s pH med 5,5 in 6 inhibirana pri dodanem PB v koncentracijah višjih od 5 mM, ter da 100 mM koncentracija PB (izmed testiranih koncentracij) popolnoma inhibira rast kvasnih celic. PA ima precej manjši učinek na rast kvasnih celic v primerjavi s PB (**slika 4.1(b)**), saj 5 in 10 mM koncentraciji PA nimata vidnega učinka na rast kvasovk, kar je tudi v skladu z objavljenimi rezultati (Lui in sod., 2004). V eksperimentu je bila rast kvasnih celic, izmed izbranih testnih koncentracij, inhibirana samo pri 100 mM koncentraciji PA, kjer so sevi razvili kolonije le iz nanešenih redčin z največjo gostoto celic, njihova rast pa je močno inhibirana v primerjavi z rastjo sevov na kontrolnem gojišču. Iz slik je tudi razvidno, da je rast kvasnih celic pri 100 mM koncentraciji PA bolj inhibirana kot pri 10 mM koncentraciji PB.

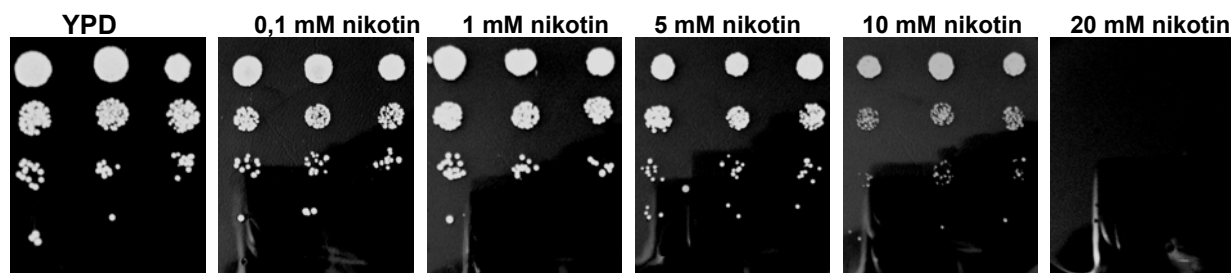
Dobljeni rezultati inhibitornih koncentracij PB in PA za kvasne celice so v skladu z že objavljenimi rezultati (Lui in sod., 2004) in potrjuje teoretično razlago prehoda šibkih kislin v celico s pasivnim transportom zaradi difuzije. Lui in sod. (2004) so za testiranje vpliva različnih koncentracij PB uporabljali bogat YPD medij, ki so ga zakisali do pH 5 in mu dodali pufer. Pri našem delu smo uporabljali podoben, bogat medij, s pH vrednostjo med 5,5 in 6 ter brez dodanega pufera. PA je nekoliko močnejša kislina od PB ($pK_a(PB)=4,7$ in $pK_a(PA)=4,3$). S pomočjo Handerson-Hasselbachove enačbe (glej poglavje 2.1.2.1), ki velja za šibke kisline, lahko izračunamo, da je delež neionizirane oblike PB v mediju s pH 5 okrog 33%, v mediju s pH 5,7 (povprečna vrednost pH v našem mediju) pa le še 9%. To pomeni, da lahko prehaja lipidni dvosloj pri isti koncentraciji PB v mediju s pH 5,7 skoraj štiri krat manj molekul PB kot v mediju s pH 5. Podobno lahko izračunamo za PA, v mediju s pH 5 je okrog 17% kemikalije v neionizirani obliki, v mediju s pH 5,7 pa manj kot 4%. Stopnja ionizacije za PA in za PB samo delno razloži višje inhibitorne koncentracije PA v primerjavi z inhibitornimi koncentracijami PB za rast kvasnih celic, zato sta za interpretacijo tega rezultata pomembna še dva faktorja: (i) PA je nekoliko manj hidrofobna substanca v primerjavi s PB (Lui in sod., 2004) in (ii) Hamiltonov (1998) model transporta maščobnih kislin, ki je reguliran z metabolizmom maščobnih kislin v celici. PB se v celici, kot derivat

maščobnih kislin, lahko metabolizira z β -oksidacijo, s tem se njegova plazemska koncentracija zmanjša in posledično je difuzija PB v celico večja. PA je končni produkt β -oksidacije nekaterih derivatov maščobnih kislin s fenilno skupino, zato se po tej poti ne transformira. Seveda pa ne smemo zanemariti tudi možnosti, da ima PB specifičen učinek na kvasovko, ki poveča njegovo toksičnost.

Kot ustrezno inhibitorno koncentracijo PB in PA za nadaljnje testiranje v kemijsko-genomski analizi smo izbrali 10 mM koncentracijo PB in PA, s tem smo želeli ugotoviti ali imata enaki koncentraciji obeh substanc podoben vpliv na delecijske mutante iz YKO zbirke. Izbranim sevom, ki smo jih identificirali v kemijsko-genomski analizi za PB, pa smo testirali rast tudi pri višji, 40 mM oziroma 100 mM koncentraciji PA.

4.2 INHIBITORNE KONCENTRACIJE NIKOTINA

Goossens in sod. (2003) so proučevali vpliv alkaloidov na rast nekaterih sevov kvasovke *S. cerevisiae* in med drugim pokazali, da 12,5 mM koncentracija nikotina v bogatem (YPD) gojišču inhibira rast kvasnih celic. Za določitev inhibitorne koncentracije nikotina smo pripravili gojišča z dodanim nikotinom v 0,1 mM, 1 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM in 100 mM koncentracijah. Primerjali smo rast redčin sevov *pdr5 Δ* , *pfk2 Δ* in divjega tipa (BY4742) na gojiščih z dodanim nikotinom z rastjo teh sevov na kontrolnem gojišču (brez nikotina) po 24h inkubacije. Iz **slike 4.2** lahko vidimo, da ima nikotin enak učinek na rast vseh treh izbranih sevov kvasovk. Študija Goossensa in sod. (2003) je pokazala, da je Pdr5p pomemben transporter alkaloidov iz kvasnih celic, saj so bile kvasovke z izbitim *PDR5* genom veliko bolj občutljive na dodane alkaloidne v primerjavi s drugimi sevi. V tej raziskavi rezultati za nikotin niso bili čisto jasni, saj so bili nekateri sevi kvasovke z nefunkcionalnim *PDR5* genom enako občutljivi na nikotin kot divji tip. Ti rezultati so v skladu z našimi rezultati in kažejo na to, da Pdr5p nima pomembne vloge pri aktivnem transportu nikotina iz kvasne celice.



Slika 4.2 Velikost kolonij na gojiščih z različnimi koncentracijami nikotina: testirani sevi (na plošči od leve proti desni) so *pdr5 Δ* , *pfk2 Δ* in divji tip (BY4742). Na posamezni plošči so zgoraj nanese redčine izbranih sevov z največjo gostoto celic (10^6 celic/ml), sledijo redčine z nižjo gostoto, spodaj so tako redčine z najnižjo gostoto (10^2 celic/ml). Nikotin inhibira rast izbranih sevov v 10 mM koncentraciji, pri 20 mM koncentraciji nikotina je rast kvasovk popolnoma inhibirana.

Pričakovali smo, da bo mutanta *pfk2 Δ* slabše tolerirala nikotin kot divji sev. Pfk2p je namreč beta podenota fosfofruktokinaze, ključnega encima v procesu glikolize, ki omogoča kvasovki fermentativno rast, nikotin pa naj bi inhibiral prenos elektronov v procesu oksidativne fosforilacije (Quik, 2004). Predhodne študije so pokazale, da mutante z nefunkcionalnim *PFK2* genom ne rastejo na glukozi, če je respiracija inhibirana, na primer z antimicinom A (Arvanitidis in Heinisch, 1994). Nikotin je po kemijski strukturi podoben nikotinamidu, zato se veže na vezavna mesta encimov, ki

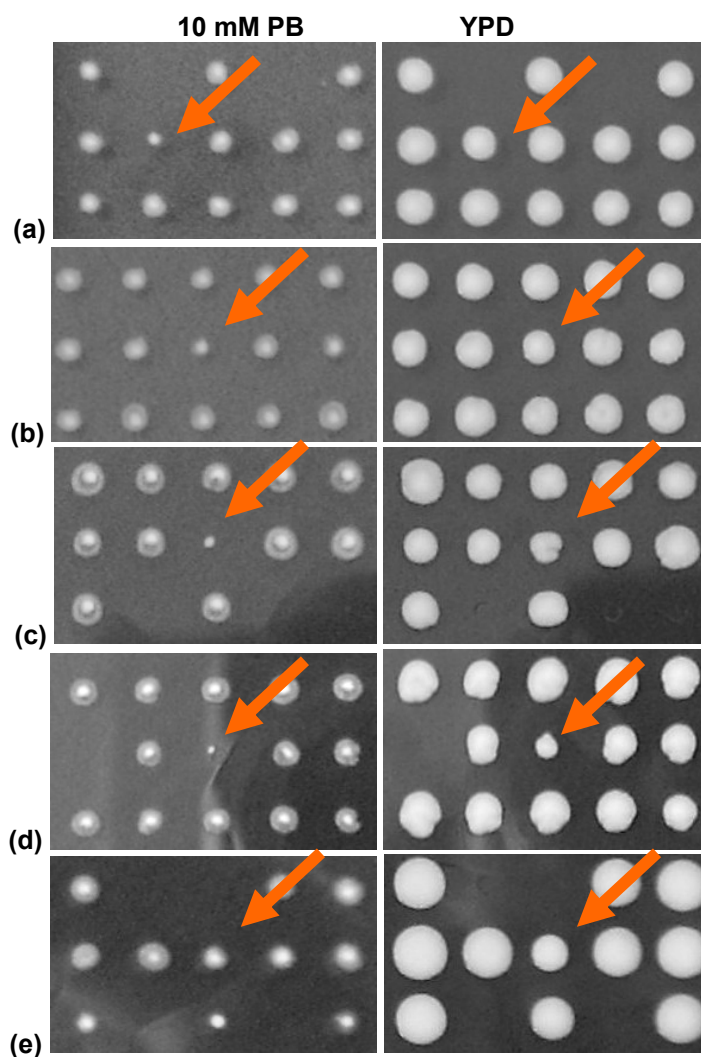
imajo substratno specifičnost do nikotinamida. Posledice tega so nižje koncentracije nikotinamida v celici, ter inhibicija procesov, v katere je vključen nikotinamid v celici (Chang. Nicotinamide..., 2004). Nikotinamid ima med drugim ključno funkcijo pri prenosu elektronov v mitohondrijski transportni verigi elektronov, zato naj bi nikotin oslabil respiratorno rast. Rezultati našega eksperimenta kažejo na to, da je sev *pfk2Δ* enako občutljiv na nikotin kot divji tip, kar si lahko razlagamo na dva načina: (i) funkcijo Pfk2p lahko nadomesti protein Pfk1p (alfa podenota fosfofruktokinaze): študije so namreč pokazale, da imata obe podenoti fosfofruktokinaze v kvasovki katalitično in regulatorno funkcijo (Arvanitidis in Heinisch, 1994) in/ali (ii) nikotin nima velikega vpliva na respiratorno rast kvasovke.

Iz **slike 4.2** lahko razberemo, da nikotin inhibira rast kvasnih celic izbranih sevov v 10 mM koncentraciji, kar je tudi v skladu z rezultati predhodne študije Goossensa in sod. (2003), kjer so uporabljali podoben medij, s podobnimi pH vrednosti. Za primerjavo naj navedemo, da je koncentracija nikotina v krvi takoj po kajenju cigarete okrog 100 ng/ml (0,6 μM) in da 20 cigaret vsebuje približno takšno dozo nikotina, ki je letalna za odraslega človeka (Hukkannen in sod., 2005). Nikotin je torej 1000 krat manj toksičen za kvasovko kot za človeka. Vzrokov je verjetno več: (i) nikotin je šibka baza (pKa= 8), zato je v kislem kvasnem mediju večji del nikotina v ionizirani obliki, kot na primer v pljučih (pH 7); (ii) znan toksičen učinek nikotina na višje organizme je njegova inhibicija nikotinskega acetil-holinskega receptorja, ki ga kvasovke nimajo in (iii) ne smemo zanemariti možnosti, da ima kvasna celica posebne transporterje, ki izločajo nikotin iz celice, kar so za nekatere alkaloidne že dokazali Goossens in sod. (2003) v njihovi študiji.

4.3 REZULTATI PRESEJALNEGA TESTA

V presejalnem testu smo testirali vpliv predhodno izbranih koncentracij PB, PA in nikotina na rast delecijskih mutant iz YKO zbirke. Rast posamezne kolonije seva smo ocenjevali vizualno in sicer relativno glede na velikost ostalih kolonij na gojišču z dodano kemikalijo in glede na velikost kolonije istega seva na kontrolnem (YPD) gojišču. S tem testom smo torej identificirali mutante, ki so rastle hitreje ali počasneje zaradi dodane testne kemikalije in jih glede na občutljivost razvrstili v pet kategorij:

1. (----) sev, ki je rasel očitno počasneje kot večina sevov na gojišču s testno substanco, na kontrolnem gojišču pa je rasel primerljivo kot večina sevov (**Slika 4.3(a)**),
2. (---) sev, ki je rasel počasneje kot večina sevov na gojišču s testno substanco, na kontrolnem gojišču pa je rasel primerljivo kot večina sevov (**Slika 4.3(b)**),
3. (--) sev, ki je rasel počasneje kot večina sevov na gojišču s testno substanco in je tudi na kontrolnem gojišču rasel malo počasneje kot večina sevov (**Slika 4.3(c)**),
4. (-) sev, ki je rasel na gojišču s testno substanco zelo slabo ali ni rasel in je tudi na kontrolnem gojišču rasel počasneje kot večina sevov (**Slika 4.3(d)**),
5. (+) sev je rasel primerljivo z ostalimi sevi na plošči z dodano testno substanco, na kontrolnem gojišču pa je rasel počasneje kot večina sevov (**Slika 4.3(e)**).



Slika 4.3 Primeri različnih fenotipov mutant zaradi dodanega 10 mM PB v gojišče: vsi primeri sevov so označeni s puščico, na levi strani so slike sevov, ki so rastle na gojišču z dodanim PB (YPD + 10 mM PB), na desni strani pa slike istih sevov, ki so rastle na kontrolnem (YPD) gojišču. **(a)** (---): kolonija seva *ent2Δ* je očitno manjša v primerjavi z ostalimi kolonijami na gojišču z dodanim PB (levo), na kontrolnem gojišču pa je sev rastle primerljivo z ostalimi sevi na tem gojišču (desno); **(b)** (---): sev *cik1Δ* je rastle počasneje v primerjavi z ostalimi sevi na gojišču z dodanim PB (levo), na kontrolnem gojišču pa je rastle primerljivo z ostalimi sevi na tem gojišču (desno); **(c)** (-): sev *san1Δ* je rastle nekoliko počasneje na kontrolnem gojišču (desno), PB pa je rast te mutante še dodatno inhibiral (levo); **(d)** (-): sev *pdr12Δ* je imel na gojišču z dodanim PB zelo inhibirano rast (levo) in tudi na YPD gojišču je njegova kolonija manjša glede na ostale kolonije na tem gojišču (desno); **(e)** (+): sev *ssz1Δ* je na gojišču z dodanim PB razvil kolonijo primerljive velikosti z večino kolonij na tem gojišču, na YPD gojišču pa je njegova kolonija manjša v primerjavi z ostalimi kolonijami na tem gojišču.

4.3.1 Kemijsko-genetski profil za fenilbutirat (PB)

V presejalnem testu z 10 mM PB smo med delecijскими mutantami iz YKO zbirke identificirali 180 mutant z izbitimi geni, katerih produkti vplivajo na rast kvasovke na PB. Rast vseh mutant na gojiščih z dodanim 10 mM PB je bila močno inhibirana v primerjavi s kontrolnimi gojišči (brez dodanega PB), zato smo gojišča s PB inkubirali 6 dni, kontrolna gojišča pa 2 dni.

Rezultati presejalnega testa s PB so prikazani v **prilogi A**, kjer so navedeni tudi biološki procesi, v katere so produkti izbitih genov identificiranih mutant vključeni v kvasni celici. Ker smo test opravili le enkrat, je med identificiranimi geni prav gotovo kar nekaj takih, ki so lažno pozitivni in gotovo je tudi nekaj takih sevov, ki jih s tem testom nismo uspeli identificirati (lažno negativni). Tem napakam se s takim testom ni mogoče povsem izogniti. Bolj zanesljive rezultate bi lahko dosegli z večjim številom ponovitev testa pri istih pogojih. Na ta način bi izločili predvsem lažno pozitivne seve, lažno negativne seve pa bi z večjim številom ponovitev pri istih pogojih težko identificirali, saj gre večinoma za seve z izbitimi geni, katerih produkti so potrebni za rast kvasovke na PB v specifičnih pogojih. Zato bi lahko nekatere izmed teh sevov identificirali s presejalnim testom s PB pri spremenjenih pogojih, na primer pri drugačnem pH gojišča, spremenjeni temperaturi inkubacije, testiranje občutljivosti sevov na različno bogatih gojiščih...

V peto kategorijo (+) smo uvrstili 35 sevov, kar pomeni, da izbitje kateregakoli izmed teh 35-ih genov poveča rezistenco kvasovke na PB. Poudariti je treba, da je zaradi same metodologije dela ta skupina identificiranih genov najbolj vprašljiva. Seve smo iz YKO zbirke namreč prenesli najprej na gojišča z dodanim PB in nato šele na kontrolna gojišča (postopek je opisan pod točko 3.2.3). Identificirani sevi so zato lahko razvili večje kolonije na gojišču s PB zaradi prenosa večjega števila celic in ne zaradi povečane rezistence na PB. Vsekakor je zanimivo, da smo v tej skupini identificirali kar nekaj genov, ki kodirajo zapise za ribosomalne proteine in so torej vključeni v proces translacije. Na sliki 4.3 (e) je prikazan primer za sev *ssz1Δ*.

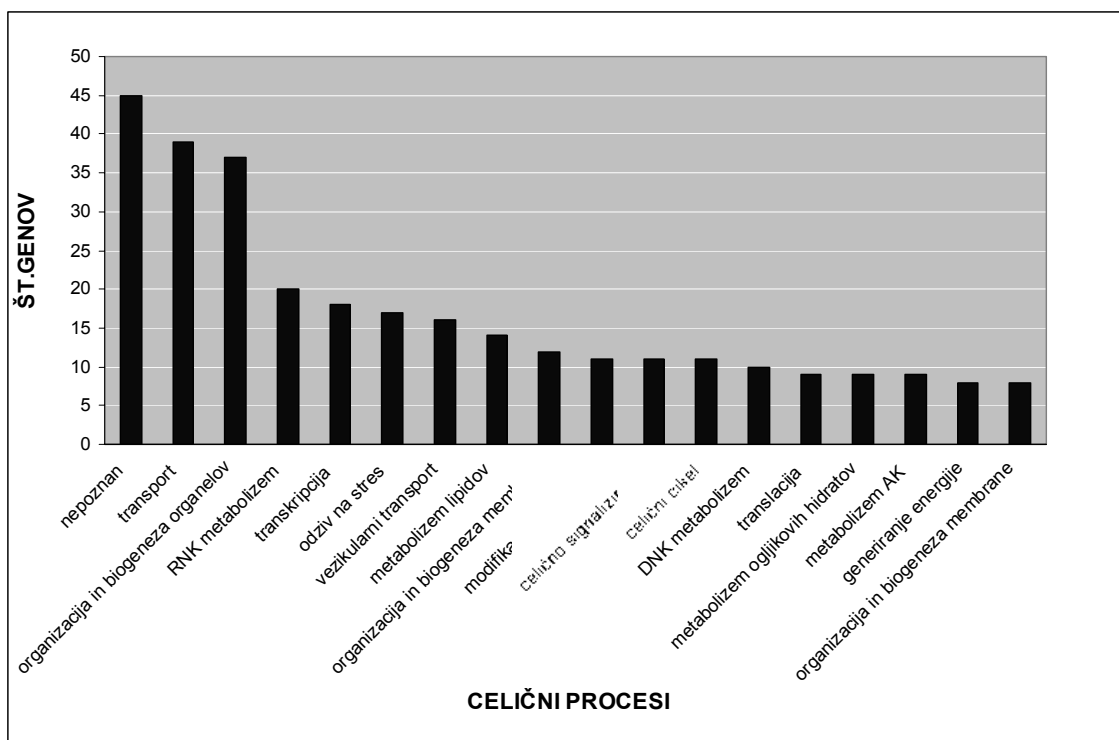
Iz priloge A je razvidno, da ima kar 46 genov (med identificiranimi) še nepoznano biološko funkcijo, med njimi je tudi nekaj genov, katerih delecija močno poveča občutljivost kvasovke na PB. Nekateri identificirani geni imajo zelo specifično funkcijo in so ključni le v določenem procesu v celici, drugi geni, oziroma njihovi produkti, pa so udeleženi v različnih celičnih procesih, kot na primer *Bmh1p*.

Kemijsko-genetski profil za 10 mM PB vsebuje 145 genov, ki so pomembni za rast kvasovke na gojišču z dodanim PB. Glede na poznane učinke PB iz literature in glede na njegove fizikalno-kemijske lastnosti, so ti rezultati, ki kažejo na nespecifičen učinek PB v celici, v skladu s pričakovanji.

4.3.1.1 Analiza rezultatov kemijsko-genetskega profila za fenilbutirat (PB)

Za analizo rezultatov kemijsko-genetskega profila smo uporabljali orodja za analizo genetskih podatkov, ki so dostopna preko svetovnega spleta na SGD - GO Resources in na URL: <http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder/GOTermFinder>. Omenjena orodja omogočajo razvrstitev izbranih genov v različne hierarhije genske ontologije (GO Term Finder). Izbiramo lahko med tremi različnimi razvrstitvami genov: glede na biološki proces, glede na molekulsko funkcijo ali glede na celično komponento.

Na **sliki 4.4** je grafični prikaz, ki prikazuje celične procese, v katere so vključeni produkti genov iz kemijsko-genetskega profila za 10 mM PB. Med različnimi hierarhijami GO Term Finder, smo izbrali tisto, ki gene deli glede na biološki proces, v katerem produkti teh genov sodelujejo. Iz grafa vidimo, da je največ genov s poznano funkcijo, katerih izbitje vpliva na spremenjeno občutljivost kvasovke na PB, vključenih v transport, oziroma v organizacijo in biogenezo organelov v kvasni celici. Po številu genov, ki jim pripadajo, sledijo naslednje GO kategorije: metabolizem RNA, transkripcija, stresni odziv celice in vezikularni transport.

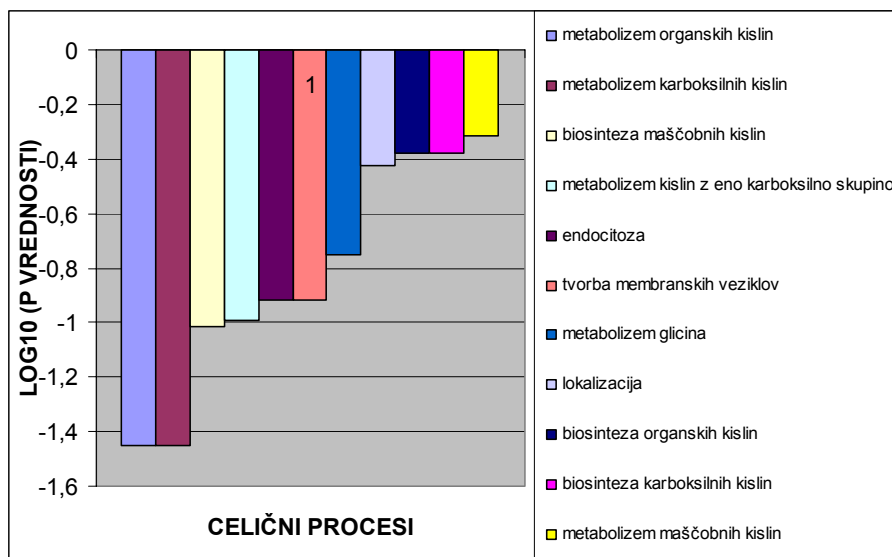


Slika 4.4 Biološka vloga genov iz kemijsko-genetskega profila za 10 mM PB v kvasni celici: graf prikazuje vključenost in razporeditev identificiranih genov (iz priloge A) v celičnih procesih. Za razporeditev genov smo uporabljali GO Slim Mapper (Yeast GO - Slim: Process), ki je dostopen na *Saccharomyces* Genome Database (1.2.2007).

V posameznih bioloških procesih sodeluje različno število genov, zato je za določitev vpliva izbrane skupine genov na določen biološki proces bolj primerna uporaba P vrednosti. Če vzamemo hipotetičen primer, da je med identificiranimi geni iz presejalnega testa x genov vključenih v GO kategorijo transport, potem je P vrednost statistično izračunana verjetnost (to je verjetnost takšne razporeditve o naključni izbiri genov), da je x ali več genov iz izbrane skupine genov (v našem primeru identificirani geni iz presejalnega testa) vključenih v določeno GO kategorijo (v našem primeru transport). Manjša kot je P vrednost, bolj je skupina izbranih genov povezana s to GO kategorijo. Uporaba P vrednosti za analizo vpliva izbrane skupine genov na določene GO kategorije je primerna tudi zaradi nepopolnih seznamov genov za posamezne GO kategorije (tako je lahko v našem hipotetičnem primeru več kot x genov vključenih v transport).

Na **sliki 4.5** je prikazan graf z biološkimi procesi na katere imajo geni iz kemijsko-genetskega profila za PB, glede na P vrednost, največji vpliv (P vrednost je manjša od 0,5). Iz grafa lahko razberemo, da imajo identificirani geni največji vpliv na metabolizem organskih kislin (P vrednost je 0,03552). Od ostalih procesov izstopata procesa tvorbe

membranskih veziklov in endocitoza, ki je neposredno povezana s slednjim procesom (P vrednost za obe GO kategoriji je 0,12121). Med procesi, ki so pomembni za rast kvasovke na PB, je tudi celično signaliziranje preko Ras proteinov (P vrednost je 0.38629) in proces ubikvitinacije (P vrednost je 0.67072). Identificirani geni, katerih delecija poveča rezistenco kvasovke na PB, pa imajo velik vpliv na proces kontrole translacije (P vrednost je 0.00441).



Slika 4.5 Statistično določen pomen genov kemijsko-genetskega profila za 10 mM PB v bioloških procesih: graf prikazuje biološke procese, na katere imajo identificirani geni iz kemijsko-genomske analize za 10 mM PB največji vpliv (P vrednost je manjša od 0,5). Zaradi lažje preglednosti smo v grafu predstavili desetiški logaritem P vrednosti. (Vir podatkov: <http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder/GOTermFinder> z dne 1.2.2007)

4.3.1.2 Vpliv PB na metabolizem organskih kislin

Rezultati kemijsko-genomske analize kažejo, da imajo geni, ki so vključeni v GO kategorijo metabolizem organskih kislin, ter v podskupini le-te: metabolizem karboksilnih kislin in biosintezo maščobnih kislin, velik vpliv na rast kvasovke na PB. GO kategorija metabolizem maščobnih kislin vključuje vse kemijske reakcije in metabolne poti, v katerih sodelujejo organske kisline, med katere sodijo tudi amino kisline in maščobne kisline. Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je PB po kemijski strukturi maščobna kislina in je zato substrat različnim encimom, ki so vključeni v procese sinteze in razgradnje organskih kislin v celici. Delecija genov, ki kodirajo zapis za te encime, zmanjša učinkovitost metabolizma PB v celici in posledično poveča toksičnost PB za kvasno celico.

Zanimivo pa je, da smo v presejalnem testu identificirali le dva gena za peroksisomske proteine (Pex28p in Ant1p), ki sta pomembna za rast kvasovke na PB. Ant1p je transporter ATP v lumen peroksisomov, regulator proliferacije peroksisomov in pomemben za vzdrževanje bazičnega pH v peroksisomih (van Roermund in sod., 2004). Študije kažejo, da je Ant1p ključen za oksidacijo maščobnih kislin s srednje dolgo verigo (van Roermund in sod., 2002). Pex28p je peroksisomski integralni protein z nepoznano molekularno funkcijo, vključen pa je v proces regulacije proliferacije peroksisomov. Identifikacija tako majhnega števila genov, ki so povezani s procesom β -oksidacije nam kaže na to, da biotransformacija PB v procesu β -oksidacije, ne prispeva veliko k manjši toksičnosti PB za kvasno celico.

4.3.1.3 Vpliv PB na proces tvorbe membranskih veziklov

Proces tvorbe membranskih veziklov je ključnega pomena pri transportu makromolekul, ki jih celica želi razgraditi (v vakuole v kvasni celici) in pri izločanju nastalih produktov razgradnje iz celice, kot tudi pri transportu lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov med organeli znotraj celice in pri njihovem prenosu iz celice (Alberts, 2002:711). Rezultati presejalnega testa s PB nam kažejo, da so kvasovke z nefunkcionalnimi geni, ki omogočajo celici tvorbo membranskih veziklov, veliko bolj občutljive na PB. To potrjuje že znani učinek PB na zmanjšano aktivnost nekaterih membranskih proteinov (Lui in sod., 2004). Za pravilno sortiranje in vgradnjo novo sintetiziranih proteinov v celično membrano je namreč ključnega pomena njihov transport s pomočjo transportnih membranskih veziklov. Endocitoza pa omogoča izločanje nefunkcionalnih membranskih proteinov in njihov transport do mest razgradnje v kvasni celici – do vakuol. Poleg tega so predhodne študije pokazale, da PB vpliva na sintezo steroidov v celici in s tem na spremenjeno fluidnost membran (Witzig in sod., 2000). Delež steroidov v membranah kvasne celice ima namreč velik vpliv na proces endocitoze (Umebayashi in Nakano, 2003). PB torej preko sinteze steroidov vpliva na sam proces endocitoze, izbitje nekaterih genov, ki sodelujejo v tem procesu, pa še dodatno oslabi celoten proces.

4.3.1.4 Vpliv PB na celično signaliziranje

Med procesi, ki so pomembni za rast kvasovke na PB, je tudi celično signaliziranje preko majhnih GTPaz in Ras proteinov. Celice se odzivajo na spremembe v okolju preko receptorjev na celični membrani, kaskado prenosa signalov pa omogočajo sekundarni obveščevalci v celičnem citosolu. V tem procesu imajo pomembno vlogo GTPaze, na katere je v neaktivirani obliki vezan GDP. GTPaza je α podenota G proteina, ki je lociran na citosolni strani membrane. Receptor na celični membrani povzroči spremembo v konformaciji GTPaze in s tem izmenjavo vezanega GDP z GTP, kar sproži v celici kaskado dogodkov pri prenosu signala. Ras proteini sodijo v družino GTPaz in so v sesalskih celicah pomembni pri prenosu informacij s strani rastnih faktorjev v celično signaliziranje, ter tako vplivajo na celično proliferacijo in diferenciacijo. Hiperaktivno delovanje Ras proteina, ki je lahko posledica mutacij v *RAS* genu ali povečane aktivnosti delovanja membranskega receptorja, vodi do nastanka raka. Kar 30% vseh tumorjev pri človeku je povezanih s hiperaktivnim delovanjem Ras proteinov (Braga-Basaria in Ringel, 2003). PB je učinkovito sredstvo pri zdravljenju nekaterih rakastih obolenj, ker poveča diferenciacijo celic in inhibira njihovo proliferacijo (Witzig in sod., 2000), čeprav mehanizem delovanja PB na transformirane celice ni še popolnoma razjasnjen. Študije so pokazale, da PB inhibira delovanje hiperaktivnih Ras proteinov v tumorskih celicah (Grzanowski in Needleman, 2002; Braga-Basaria in Ringel, 2003). Lui in sod. (2004) razlagajo, da je PB učinkovit pri zdravljenju raka predvsem zaradi njegovega inhibitornega delovanja na nekatere membranske receptorje. S presejalnim testom z 10 mM PB smo identificirali kar nekaj genov, katerih produkti so vključeni v celično signaliziranje preko Ras proteinov (*BMH1*, *SLG1*, *BEM4*, *RAS2 in BMH2*), kar je torej v skladu z že objavljenimi rezultati, ki povezujejo delovanje PB s celičnim signaliziranjem preko Ras proteinov oziroma GTPaz.

4.3.1.5 Avksotrofni sevi za aromatske amino kisline (AK) so občutljivi na PB

Kemijsko-genetski profil za PB vsebuje kar deset genov, ki so povezani s procesi metabolizma AK (Priloga A). Med najbolj občutljivimi sevi na PB smo identificirali tudi seve, ki so avksotrofni za aromatske AK: *aro2 Δ* , *aro4 Δ* in *aro7 Δ* . Aro2p in Aro4p sta

encima, vključena v pot biosinteze vseh treh aromatskih AK: triptofana, tirozina in fenilalanina. Aro7p pa katalizira reakcijo v biosintetski poti tirozina in fenilalanina (Braus, 1991). Rezultati naših eksperimentov kažejo torej na to, da so najbolj občutljivi za rast na PB tisti sevi, ki niso sposobni sintetizirati AK tirozin in fenilalanin. Ti rezultati so v skladu z objavljenimi rezultati Lui in sod. (2004). V njihovem eksperimentu so poleg omenjenih sevov kot občutljive na PB identificirali tudi vse delecije mutante z izbitimi geni, ki so vključeni v sintezo triptofana (*trp1-5Δ*) ter še nekaterih drugih AK (*ilv1Δ*, *thr1Δ*, *thr4Δ*, *cys4Δ*), kar pa se ne ujema z našimi rezultati. Rezultati našega eksperimenta namreč kažejo, da sevi avksotrofni za triptofan nimajo inhibirane rasti zaradi dodanega PB v gojišče.

Študije so pokazale, da PB inhibira privzem triptofana in nekaterih drugih AK v celico (Lui in sod., 2004; Grzanowski in Needleman, 2002). Učinek PB na kvasne celice primerjajo z učinkom imunosupresorja FK506 in rapamicina, ki tudi inhibirata transport triptofana v celico (Grzanowski in Needleman, 2002). Znana tarča obeh substanc v celici je protein FKBP12 (Fpr1p), na katerega se vežeta in tvorita z njim kompleks. Kompleks FKBP12/FK506 inhibira kalcinevrin, kompleks FKBP12/rapamicin pa Tor1p (Dolinski in sod., 1997). Protein FKBP12, ki je evolucijsko zelo ohranjen in prisoten v vseh organizmih, ima pomembno vlogo v procesu zvijanja proteinov in v regulaciji aktivnosti membranskih proteinov (Dolinski in sod., 1997). Študije so pokazale, da stradanje za AK, ki ga v celici povzroči tudi FK506, kot inhibicija Tor1p inducira razgradnjo permeaze Tat2p, glavnega transporterja triptofana v celico, preko procesa ubikvitinacije (Lui in sod., 2004; Beck in sod., 1999).

Mehanizem delovanja PB in drugih substanc na zmanjšano aktivnost AK permeaz še ni popolnoma razjasnjen, saj kvasna celica kot odgovor na pomanjkanje samo ene AK inducira transkripcijo vsaj 30 genov, ki so vključeni v sintezo te in drugih AK, ter sproži kaskado dogodkov v celici, katerih poti še niso popolnoma pojasnjene (Braus, 1991). Predhodne študije so podale več razlag mehanizma delovanja PB na manjšo aktivnost AK permeaz: (i) PB inhibira transport AK kot šibka kislina (Bauer in sod., 2003); (ii) PB inducira vezavo ubikvitina na permeaze in s tem aktivira njihovo razgradnjo (Beck in sod., 1999) in PB deluje kot inhibitor transporta aromatskih AK zaradi strukturne podobnosti tem AK (Lui in sod., 2004). PB je po strukturi najbolj podoben AK tirozin in fenilalanin, zato lahko deluje kot kompetitor teh AK za vezalna mesta na AK permeazah. Ta razlaga delovanja PB je tudi najbolj v skladu z rezultati našega eksperimenta, saj smo kot najbolj občutljive mutante na PB identificirali seve, ki so avksotrofne za tirozin in fenilalanin.

4.3.1.6 Stresni odziv celice na PB

Iz kemijsko-genetskega profila za PB (Priloga A) lahko vidimo, da smo identificirali kar 19 genov, ki omogočajo rast kvasovki v prisotnosti PB, povezanih s procesom celičnega odziva na stres. Med temi geni so tudi nekateri iz skupine MRG genov (angl. »multidrug resistance genes«), ki omogočajo celici rezistenco na različne kemikalije. Organizmi so z evolucijo razvili različne membranske črpalke, ki črpajo toksične snovi iz celice in s tem povečajo odpornost organizma na te substance. Izražanje teh genov je regulirano s transkripcijskimi faktorji, ki se aktivirajo v prisotnosti stresorja. Zanimivo je, da je med identificiranimi stresnimi geni kar nekaj vključenih v proces ubikvitinacije in s tem v proces razgradnje proteinov (*SSK1*, *DOA1*, *SAN1*).

V presejalnem testu s PB sta mutanti *pdr12Δ* in *war1Δ* slabše rastle na gojišču s PB, kar kaže na to, da je PB substrat transporterju Pdr12p, ki omogoča rezistenco kvasovki na

različne šibke kisline (Bauer in sod., 2003). V prisotnosti šibkih kislin se zaradi aktivacije transkripcijskega faktorja War1p koncentracija Pdr12p močno poveča (Kren in sod., 2002).

Poznanih je kar nekaj transkripcijskih faktorjev za *MRG* gene v kvasni celici, med katerimi je tudi *STB5* (Akache in sod., 2004), ki smo ga v presejalnem testu identificirali kot pomembnega za rast kvasovke na PB. Zanimivo je, da Stb5p aktivira transkripcijo *MRG* genov preko deacetilacijskega, histonskega Rpd3p kompleksa (veže se na Sin3p, komponento Rpd3p kompleksa), ki je regulator transkripcije genov vključenih v proliferacijo celice (Bradley in sod., 2000). Znano je namreč, da PB inhibira histonske deacetilaze in tako vpliva na transkripcijo nekaterih genov pomembnih za celično rast in delitev, kar je tudi ena izmed razlag za učinkovito zdravljenje nekaterih tumorskih celic s PB (Marks in sod., 2000; Wright in sod., 2003). Dokazano je bilo, da je PB učinkovit pri zdravljenju bolezni srpastih celic, ker inducira transkripcijo normalnega fetalnega hemoglobina (Kang in sod., 2001).

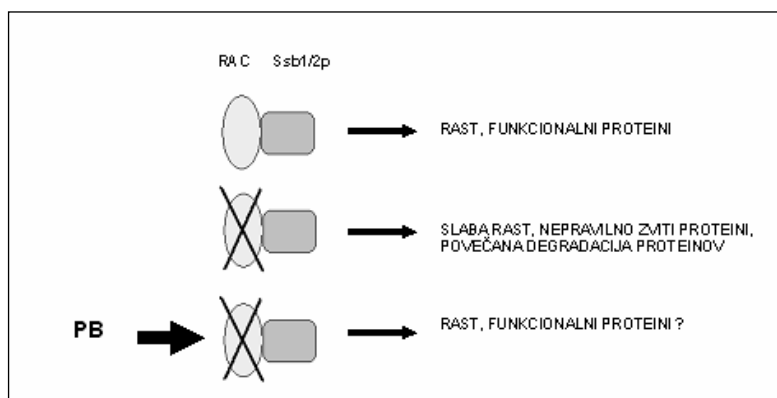
4.3.1.7 Vpliv PB na proces translacije

Med geni, katerih delecija poveča rezistenco na PB, smo identificirali veliko genov, ki so povezani s procesom nastajanja in zvijanja proteinov. Tako smo kot rezistenčne seve na PB identificirali nekatere mutante z nefunkcionalnimi ribosomalnimi proteini: *rps9bΔ*, *rpl43aΔ*, *rpl22aΔ*, *rpp1bΔ*, *rpl2bΔ* in *rpl13bΔ*, ter mutanti *zuo1Δ* in *ssz1Δ*, ki imata izbita gena, pomembna v začetni fazi zvijanja proteinov. Proteini, ki jih kodirajo geni, katerih mutacija vodi do povečane rezistence na PB, predstavljajo možne kandidate za celične tarče PB.

Zuo1p spada v skupino J proteinov (ali Hsp40p) in skupaj s Ssz1p (iz skupine Hsp70p) sestavljata RAC kompleks (angl. »ribosome-associated complex«), ki se veže na šaperon Ssb1p ali Ssb2p (Huang in sod., 2005). Molekulski šaperoni imajo v celici pomembno vlogo v procesu zvijanja novo sintetiziranih proteinov, sodelujejo pri njihovem transportu znotraj celice do organelov ali do membrane in pri degradaciji nepravilno zvitih proteinov (Alberts, 2002: 356). Hsp70 proteini so molekulski šaperoni, ki so prisotni tako v prokariotskih kot v evkariotskih celicah, kjer sodelujejo pri uravnavanju polipeptidne verige v začetni fazi transkripcije proteinov (Rubenstein in Lyons, 2001). Koncentracija Hsp70p se v celici običajno močno poveča zaradi delovanja različnih stresnih delavnikov. Ssb1p in Ssb2p sta funkcijska homologa iz skupine Hsc70p. Hsc70p (»Heat Shock Cognate«) je podskupina Hsp70 proteinov, ki so prisotni v celici tudi v normalnih pogojih in njihovega izražanja ne inducira stresor. Hsc70p se, podobno kot ostali Hsp70p, vežejo na hidrofobne amino kisline na nastajajoči polipeptidni verigi, ter tako preprečijo agregacijo in nepravilno zvijanje proteinov, poleg tega imajo tudi pomembno vlogo pri degradaciji nepravilno zvitih ali poškodovanih proteinov (Wright in sod., 2003).

Predhodne študije so pokazale, da PB v celici vpliva na večje izražanje genov, ki kodirajo zapis za nekatere stresne proteine iz družine Hsp70 in Hsp110, ter za metalotioneine (Wright in sod., 2003). Raziskave Rubsteina in Lyonsa (2001) pa so razkrile, da imajo celice, ki rastejo na PB, 40 - 50% nižje koncentracije Hsc70p. Njuni eksperimenti kažejo na to, da je vzrok za nižje koncentracije Hsc70p povečana degradacija *HSC70* mRNA preko ubikvitinske poti razgradnje, ne pa manjša transkripcija *HSC70* genov.

Bolezen cistična fibroza nastane v večini primerov zaradi znane mutacije v genu, ki kodira zapis za ABC transporter, pomemben za transport kloridnih ionov. Posledica te mutacije je vezava ubikvitinov na novo sintetizirane transporterje in njihova razgradnja, čeprav so zaradi mutacije še vedno delno funkcionalni (Wright in sod., 2003). PB je pri zdravljenju cistične fibroze učinkovit predvsem zaradi večjega izražanja Hsp proteinov, kar poveča kapaciteto zvižanja ABC transporterjev, hkrati se koncentracija Hsc70 proteinov zaradi PB v celici zmanjša, kar vpliva na manjšo razgradnjo transporterjev (Wright in sod., 2003). Delež vgrajenih mutiranih ABC transporterjev v celično membrano je torej pogojen z razmerjem koncentracij Hsp70p in Hsc70p v celici (Wright in sod., 2003). Študije vpliva PB pri zdravljenju diabetesa tipa 2 so pokazale, da ima PB podoben učinek tudi na membranske receptorje inzulina, ki so pri tej bolezni običajno manj učinkoviti – PB poveča kapaciteto zvižanja receptorjev inzulina v celicah miši in na ta način poveča aktivnost inzulina (Ozcan in sod., 2006).



Slika 4.6 Sintetsko genetske in kemijsko genetske interakcije med RAC kompleksom (Zuo1p in Ssz1p), Ssb1/2p in PB: šaperon Ssb1/2p s pomočjo RAC kompleksa (Zuo1p in Ssz1p) uravnava novo sintetizirano polipeptidno verigo in tako preprečuje agregacijo proteinov (zgoraj). Izbijanje ZUO1 ali SSZ1 gena (na sliki označeno kot prekrižan RAC kompleks) vpliva na povečano koncentracijo nepravilno zviti proteinov in s tem se poveča njihova razgradnja (sredina). Delejski mutanti *zuo1Δ* in *ssz1Δ* imata zato v normalnih pogojih (YPD gojišče) počasnejšo rast v primerjavi z drugimi sevi. Iz naših rezultatov (priloga D) je razvidno, da je rast mutant *zuo1Δ* in *ssz1Δ* na gojišču s PB primerljiva z rastjo divjega seva na tem gojišču, kar kaže na to, da PB v celici nadomesti funkcijo RAC kompleksa (spodaj).

Na sliki 4.6 so prikazane sintetsko genetske interakcije med RAC kompleksom (Zuo1p in Ssz1p) in šaperonom Ssb1p oziroma Ssb2p. RAC kompleks poveča ATPazno aktivnost šaperona Ssb1/2p in na ta način regulira jakost interakcij aktivnega mesta Ssb1/2p s hidrofobnimi amino kislinami na polipeptidni verigi nastajajočega proteina. Vezava RAC kompleksa in Ssb1/2p na polipeptidno verigo ščiti nastajajoči protein pred nezaželenimi interakcijami, preprečuje njegovo agregacijo in mu omogoča funkcionalno konformacijo (Huang in sod., 2005). Naši rezultati kažejo, da je rast mutant z nefunkcionalnim ZUO1 ali SSZ1 genom inhibirana na kontrolnem gojišču (YPD), kar je v skladu z objavljenimi rezultati (Huang in sod., 2005). Iz naših rezultatov je prav tako razvidno, da mutanti *zuo1Δ* in *ssz1Δ* na gojišču s PB nimata manjše rasti v primerjavi z drugimi sevi (**priloga D**). Zato predpostavljamo, da PB vpliva v celici na procese, ki povečajo delež funkcionalnih proteinov in na ta način nadomesti funkcijo RAC kompleksa v mutantih *zuo1Δ* in *ssz1Δ*.

Predlagamo naslednje razlage delovanja PB, ki pa se ne izključujejo: (i) PB deluje kot kemijski šaperon (Ozcan in sod., 2006) - med hidrofobnimi amino kislinami polipeptidne verige in fenilnim delom PB prihaja v celici do hidrofobnih interakcij in na ta način PB

delno nadomesti funkcijo šaperona Ssb1/2; (ii) PB inducira izražanje nekaterih šaperonov v celici (Wright in sod., 2003), ki lahko tudi nadomestijo funkcijo šaperona Ssb1/2 in (iii) PB inhibira proces razgradnje proteinov - PB vpliva na manjše koncentracije Hsc70p, med katere sodita Ssb1p in Ssb2p (Rubsteina in Lyonsa, 2001), ki imata pomembno vlogo tudi v procesu degradacije proteinov v celici (Ohba, 1997).

Predhodne študije delovanja PB, kot tudi naši rezultati kažejo torej na to, da ima PB velik vpliv na procese povezane s pravilnim zvijanjem proteinov in s tem na njihovo sortiranje: v vakuolo, za razgradnjo ali transport do membrane.

4.3.2 Kemijsko-genetski profil za fenilacetat (PA)

Rezultati eksperimenta, kjer smo določevali inhibitorno koncentracijo PA kažejo, da 10 mM koncentracija PA nima inhibitornega učinka na rast testiranih sevov (slika 4.1 (b)). Ker smo želeli preveriti hipotezo, da je biološki učinek PB posledica delovanja PA, ki nastane v procesu β -oksidacije iz PB, smo za obe substanci uporabili enako, 10 mM koncentracijo. S takim testiranjem smo želeli identificirati tudi gene, ki so pomembni za rast kvasovke na PA. Delecijska mutanta, ki ima izbit eden izmed teh hipotetičnih genov, bi namreč po naših pričakovanjih imela inhibirano rast tudi pri 10 mM koncentraciji PA. Kot smo pričakovali, je bila rast sevov na 10 mM PA primerljiva z rastjo sevov na kontrolnem gojišču, zato smo vsa gojišča inkubirali dva dni.

S presejalnim testom za 10 mM PA smo identificirali 32 delecijskih mutant, ki so imele spremenjeno rast zaradi dodanega PA v gojišče. Rezultati so prikazani v **prilogi B**, kjer so navedeni tudi biološki procesi, v katere so produkti izbitih genov identificiranih mutant vključeni v kvasni celici.

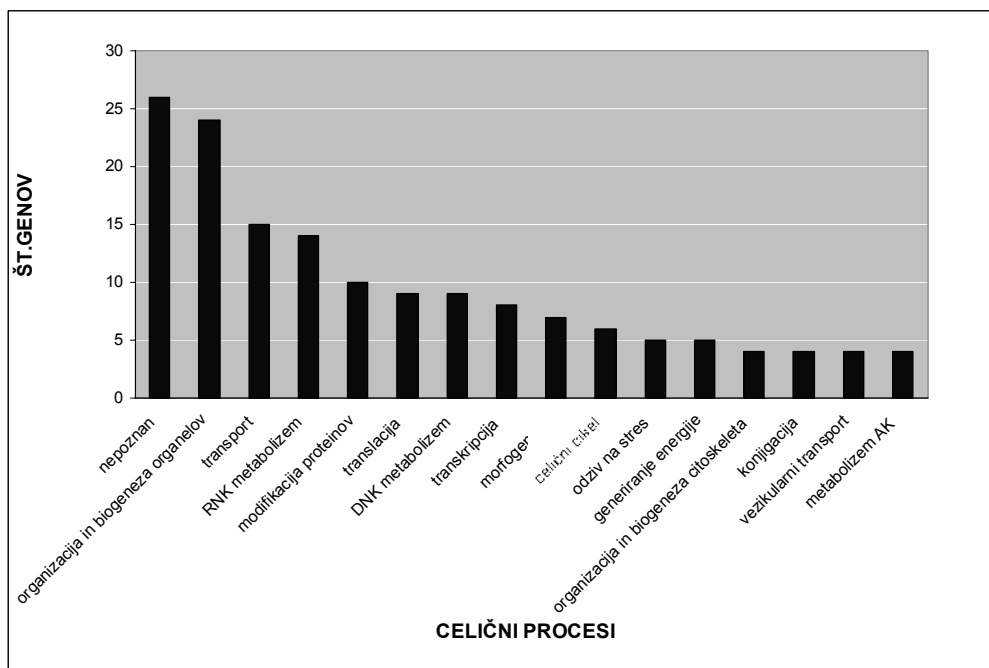
Analiza rezultatov kemijsko-genetskega profila za 10 mM PA s pomočjo orodja za analizo genetskih informacij (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder/GOTermFinder>, 16.2.2007) nam pokaže, da 10 mM koncentracija PA nima značilnega učinka na določen proces v kvasovki (P vrednost = 1). Prav tako je iz **priloge B** razvidno, da nobeden izmed izbitih genov delecijskih mutant ni specifično pomemben za rast kvasovke na 10 mM PA, saj ni imel nobeden sev iz YKO zbirke zelo inhibirane rasti zaradi PA.

Na gojišču z 10 mM koncentracijo PA smo identificirali 9 sevov z nekoliko inhibirano rastjo, ostali identificirani sevi pa so razvili na gojišču s PA večje kolonije kot na kontrolnem gojišču (priloga B). Poudariti moramo, da so rezultati za to kategorijo (+) nezanesljivi, zaradi same metodologije dela, kar smo že omenili v točki 4.3.1. Zanimivo pa je, da sta med temi sevi mutanti *zuo1 Δ* in *rpl43a Δ* , ki smo ju tudi v presejalnem testu s PB uvrstili v kategorijo rezistenčnih sevov na PB (+).

Primerjava kemijsko-genetskih profilov za 10 mM PA in PB nam pokaže, da imajo le trije sevi podoben odziv na obe substanci (v prilogi B so označeni z rdečo barvo). Poleg *zuo1 Δ* in *rpl43a Δ* , se je enako odzivala na PA in PB še mutanta *pdr12 Δ* , ki je imela inhibirano rast na obeh gojiščih z dodanima testnima substancama. To najverjetneje pomeni, da je Pdr12p pomembna črpalka za anione PB in PA in s tem omogoča kvasovki večjo rezistenco na obe substanci.

4.3.3 Kemijsko-genetski profil za nikotin

Za testiranje občutljivosti delecijskih mutant iz YKO zbirke na nikotin smo izbrali 10 mM koncentracijo nikotina. Sevi na gojiščih z nikotinom so imeli rahlo inhibirano rast v primerjavi s sevi na kontrolnih gojiščih, zato smo vsa gojišča inkubirali 2 dni. Rezultati eksperimenta so prikazani v **prilogi C**, kjer so navedeni tudi biološki procesi, v katere so produkti izbitih genov identificiranih mutant vključeni v kvasni celici. Identificirali smo 99 mutant s spremenjenim fenotipom (rastjo) zaradi nikotina, od teh ima kar 26 sevov izbite gene, katerih funkcija v celici še ni poznana.



Slika 4.7 Biološka vloga genov iz kemijsko-genetskega profila za 10 mM nikotin v kvasni celici: graf prikazuje vključenost in razporeditev identificiranih genov (iz priloge C) v celičnih procesih. Za razporeditev genov smo uporabljali GO Slim Mapper (Yeast GO – Slim : Process), ki je dostopen na *Saccharomyces* Genome Database (16.2.2007).

Na **sliki 4.7** je graf, ki prikazuje razporeditev identificiranih genov iz kemijsko-genetskega profila za nikotin v bioloških procesih v kvasovki. Za razvrstitev genetskih podatkov iz priloge C v različne genske ontologije glede na biološki proces smo uporabljali orodje, ki je dostopno preko svetovnega spleta na *Saccharomyces* Genome Database. Iz grafa je razvidno, da je največ identificiranih genov s poznano funkcijo povezanih s procesom organizacije in biogeneze organelov, transportom in metabolizmom RNA.

Podatke smo analizirali tudi s pomočjo orodja za analizo genetskih podatkov, ki je dostopno na strani <http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder/GOTermFinder>. Rezultati za celoten nabor genov iz kemijsko-genetskega profila za nikotin nam kažejo na to, da je razporeditev identificiranih genov po kategorijah GO podobna naključni razporeditvi (P vrednost je 1). Zato smo analizirali posebej nabor identificiranih genov, ki povečajo občutljivost kvasovke na nikotin in nabor genov, katerih izbitje poveča rezistenco kvasovke na nikotin. Rezultati analize so pokazali, da so geni iz (+) kategorije povezani s procesom obnavljanja telomer (P vrednost je 0,793). Geni, ki blažijo toksičen učinek nikotina na kvasovko, pa so povezani predvsem z GO kategorijo metabolizem koencimov (P vrednost je 0,0036).

4.3.3.1 Vpliv nikotina na proces izrezovanja intronov

Med najbolj občutljivimi sevi na nikotin sta tudi *msl1Δ* in *lst3Δ*. Msl1p in Ist3p sta komponenti ribonukleoproteinskega kompleksa U2snRNP, ki je sestavni del izrezovalnega telesca (angl. »spliceasom«) in ima pomembno vlogo pri zorenju mRNA. V evkariontih se prekursorske mRNA molekule v jedru pred prenosom do ribosomov, kjer se prevedejo, kemijsko modificirajo. Kodirajoče regije na genu, imenovane eksoni, so v evkariontskih celicah prekinjene z nekodirajočimi območji, ki jim pravimo introni, zato se iz novo sintetizirane prekursorske mRNA introni izrežejo, eksonski fragmenti pa se povežejo v zrelo, funkcionalno mRNA. Te zapletene kemijske reakcije katalizira izrezovalno telesce, ribonukleinski kompleks sestavljen iz petih filogenetsko zelo ohranjenih malih jedrnih RNA (snRNA), ki so povezane z več kot 70 proteini v male jedrne ribonukleinske komplekse snRNP (Wang in Rymond, 2003). Glavni katalizatorji reakcij izrezovanja intronov so male jedrne RNA, proteini pa imajo pomembno vlogo pri zagotavljanju energije (večinoma s hidrolizo ATP), ki poganja te reakcije (Staley in Guthrie, 1998). Komponenta U2snRNP se veže na razvejitveno mesto introna na prekursorski mRNA in je ključna v začetni stopnji katalitičnega izrezovanja intronov, ter za povezavo ostalih komponent v skupen kompleks izrezovalnega telesca (Stevens in sod., 2002). Rezultati presejalnega testa z nikotinom kažejo, da sta komponenti U2snRNP kompleksa (proteina Msl1p in Ist3p) pomembni za rast kvasovke na nikotinu. Ker njuna vloga ni še popolnoma pojasnjena, ne smemo zanemariti možnosti, da mogoče blažita toksičen vpliv nikotina na kvasovko preko procesov, ki niso povezani z izrezovanjem intronov in v katerih imata lahko tudi pomembno vlogo. V dostopni literaturi nismo dobili podatkov, ki bi povezovali delovanje nikotina z aktivnostjo izrezovalnega telesca v celici.

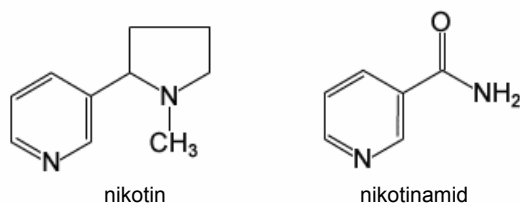
4.3.3.2 Vpliv nikotina na telomerazno aktivnost

Med identificiranimi geni kemijsko-genomskega profila za nikotin je kar nekaj genov povezanih s procesom obnavljanje telomer. Telomeri so prosti konci linearne DNA v evkariontski celici. Sintezo teh koncev DNA katalizira proteinski kompleks telomeraza, ki vsebuje tudi molekulo RNA, katera služi kot matrica za dodajanje nukleotidov. Med normalnimi celičnimi cikli se v večini človeških celic pri vsaki delitvi telomeri skrajšajo, kar morda deluje kot biološka ura za celično delitev. Prekratke telomere namreč preprečujejo telomerazno aktivnost in celična delitev je tako zavrta (Boyer, 2005:282). Študije so pokazale, da imajo kadilci povečano aktivnost telomeraze, kar je lahko eden izmed vzrokov za nastanek pljučnega raka, saj je za nekatere rakave celice značilna povečana aktivnost telomeraze (Targowski in sod., 2005). Gatbonton in sod. (2006) so proučevali dolžino telomer delecijjskih haploidnih mutant kvasovke in tako ugotovili, kateri geni vplivajo na dolžino telomer. V tej študiji so identificirali 72 kvasnih genov, katerih izbitje vpliva na krajše telomere in 80 genov, katerih izbitje vpliva na daljše telomere v kvasni celici. Med temi geni so tudi nekateri geni iz kemijsko-genetskega profila za nikotin: *FYV4*, *CDC73*, *PRS3*, *CBC2*, *MRM2*, *RPL34B* in *RPS16B* (v prilogi C so označeni z rdečo barvo). Rezultati torej potrjujejo hipotezo o vplivu nikotina na proces obnavljanja telomer in na njegovo aktivno vlogo pri nastanku nekaterih vrst rakastih obolenj.

4.3.3.3 Vpliv nikotina na metabolizem koencimov

Koencimi so organske, neproteinske molekule, ki jih potrebujejo nekateri encimi za pravilno delovanje. Nikotinamid (imenovan tudi vitamin B3) je kot prekursor molekule NADH vključen v večino oksidoredukcijskih reakcij v celici. Potrebne količine

nikotinamida dobijo kvasne celice, tako kot tudi človeške, iz hrane ali s sintezo iz aminokislina triptofana. Molekula NAD⁺ (oksidirana oblika) je kot koencim vključena v številne reakcije oksidacij v celici, v katerih se reducira v obliko NADH. NADH se spet oksidira v NAD⁺ obliko tako, da odda elektrona kompleksu I (NADH dehidrogenazni kompleks) iz prenešalne verige elektronov, kar omogoča generiranje energije v obliki molekul ATP.



Slika 4.8 Primerjava kemijske strukture molekule niktina in niktinamida: čeprav imata podobno strukturo, je njuna vloga v organizmu zelo različna (Chang. Nicotinamide,...2004).

Iz **slike 4.8** je razvidna strukturna podobnost med molekulo niktina in niktinamida, zato lahko v celici niktin tekmuje z niktinamidom za vezavna mesta na encimih in na ta način inhibira številne procese, v katerih je kot koencim vključena molekula NADH ali NAD⁺ (Chang. Nicotinamide..., 2004). To so potrdile tudi nekatere študije, ki so razkrile, da niktin med drugim inhibira kompleks I iz prenašalne verige elektronov in na ta način vpliva na proces generiranja energije v celici (Quik, 2004).

V presejalnem testu za niktin smo identificirali kar nekaj genov, ki so vključeni v metabolizem NADH in v celično dihanje: *FUM1*, *YDR115W*, *COQ10*, *GSY1*, *AYB2* in *NPY1*, kar potrjuje hipotezo, da je niktin med drugim toksičen za celico zaradi njegove strukturne podobnosti z niktinamidom.

4.3.3.4 Izločanje niktina iz kvasne celice

Kvasovka ima posebne transporterje, s pomočjo katerih lahko izloča nekatere kemikalije iz celice, med drugim tudi nekatere alkaloida (Goossens in sod., 2003). Tako so mutante z nefunkcionalnim *PDR5* genom zelo občutljive na rastlinska alkaloida skopolamin in hiosciamin (Goossens in sod., 2003), ki sta derivata tropana in podobno kot niktin delujeta na acetilholinske receptorje v višjih organizmih. Z eksperimentom, kjer smo določali inhibitorno koncentracijo niktina (poglavje 4.2) smo pokazali, da *Pdr5p* nima pomembne vloge v transportu niktina iz celice. To so potrdili tudi rezultati presejalnega testa z niktinom, ki kažejo na to, da kvasna celica nima specifičnega transporterja za izločanje niktina iz celice. To pomeni, da ga morda metabolizira.

4.3.3.5 Zaključki kemijsko-genomske analize za niktin

Iz dostopne literature smo dobili zelo malo podatkov o farmakokinetiki in farmakodinamiki niktina v kvasni celici, zato je interpretacija rezultatov kemijsko-genomske analize za niktin zelo težka. Prav tako nismo dobili podatkov o učinkih niktinu podobnih substanc na kvasovko, s katerimi bi lahko naše rezultate primerjali. Glede na naše rezultate lahko zaključimo, da niktin verjetno nima specifičnega učinka na določen proces v kvasovki, pač pa ima zaradi strukturne podobnosti z niktinamidom vpliv na različne procese, v katerih sodeluje tudi NADH. V kemijsko-genetskem profilu za niktin je tudi nekaj genov, katerih delež vpliva na telomerazno

aktivnost v kvasovki, kar mogoče potrjuje aktivno vlogo nikotina pri razvoju »cigaretnih rakov«. Ker s presejalnim testom nismo identificirali nobenega izmed poznanih transporterjev kot pomembnega za izločanje nikotina iz kvasne celice predvidevamo, da se nikotin v kvasovki metabolizira. Poti biotransformacije nikotina v kvasovki, kot tudi encimi, ki pri tem sodelujejo, pa so še popolnoma nepoznani.

4.4 PRIMERJAVA VPLIVOV DELOVANJA FENILACETATA (PA) IN FENILBUTIRATA (PB) NA KVASNO CELICO

Izbrane seve iz kemijsko-genomskega profila za PB smo dodatno testirali s testom z redčinami na agarnih ploščah. Poleg potrditve rezultatov za PB smo s tem testom želeli tudi ugotoviti, če se isti sevi enako ali podobno kot na PB odzivajo tudi na PA, zato smo vse izbrane seve nanесли na gojišča s 10 mM PB, gojišča s 100 ali 40 mM PA in na kontrolna YPD gojišča. Postopek je opisan pod točko 3.2.4.

Za testiranje z redčinami smo izbrali 28 sevov in sicer: 22 sevov, ki so v presejalnem testu rastle počasneje zaradi dodanega PB, 2 seva, ki sta rastle hitreje na gojišču s PB (teh 24 sevov smo v prilogi A označili z dodatnim senčenjem) in 4 seve, ki v presejalnem testu s PB niso pokazali občutljivost na PB (*yeh1Δ*, *gdh3Δ*, *vps1Δ*, *nil3Δ*).

Slike gojišč z redčinami izbranih sevov so zbrane v **prilogi D**. Iz slik vidimo, da lahko seve glede na njihov odziv na PB in PA razdelimo v štiri kategorije:

1. sevi, katerih rast ni spremenjena zaradi PA ali PB v gojišču: *ant1Δ*, *fpr3Δ*, *gat2Δ*, *rsb1Δ*, *doa1Δ*, *yap1801Δ*, *bmh2Δ*, *yeh1Δ*, *gdh3Δ*, *nil3Δ*, *dnf2Δ*, *pex28Δ*, *pdr12Δ*, *vps1Δ*, *ras2Δ* in *tat2Δ*;
2. sevi, ki imajo glede na divji tip povečano občutljivost na PA in PB: *ent2Δ*, *yeh2Δ*, *war1Δ* in *mga2Δ*;
3. sevi, ki imajo glede na divji tip povečano občutljivost samo na PB: *izh3Δ*, *gtr1Δ*², *kin1Δ*;
4. sevi, ki imajo glede na rast istih sevov na kontrolnem gojišču in glede na rast divjega tipa na gojišču s PB, povečano rezistenco na PB : *ssz1Δ* in *zuo1Δ*.

S testom z redčinami smo potrdili rezultate le za 9 sevov, od 24 sevov, ki so v presejalnem testu s 10 mM PB imeli spremenjen fenotip zaradi PB, kar nam kaže na različno občutljivost obeh testov. Po nekaterih podatkih naj bi s testom z redčinami potrdili od 50-80% sevov, ki so se izkazali za občutljive v presejalnem testu (Parsons in sod., 2004). Rezultati ravnih krivulj za seve *doa4Δ*, *dnf2Δ*, *tat2Δ*, *war1Δ*, *pex28Δ*, *bmh1Δ* in *ras2Δ* v mediju z 10 mM PB (U. Petrovič, neobjavljeni podatki) so potrdili občutljivost na PB za sev *war1Δ*, prav tako je iz ravnih krivulj sevov *dnf2Δ*, *pex28Δ*, *ras2Δ* in *bmh1Δ* razvidno, da imajo ti sevi nekoliko inhibirano rast v mediju s PB v primerjavi z divjim sevom. Ti štiri sevi v testu z redčinami niso imeli inhibirane rasti na gojišču s PB (priloga D), kar bi lahko pomenilo, da je presejalni test bolj občutljiv kot test z redčinami. Rezultati ravnih krivulj niso potrdili občutljivosti na PB za seva *tat2Δ* in *doa4Δ*, saj sta njuni ravnih krivulji primerljivi z ravnih krivuljo divjega seva v mediju s PB. Vendar, ker v vseh omenjenih testih delamo z živimi organizmi, ne moremo mimo dejstva, da na fenotipsko variabilnost sevov vplivajo poleg testne substance tudi drugi faktorji (npr. mikroklima, razlike pri prenosu sevov, nehomogeno gojišče...), zato bi bilo potrebno opraviti več testiranj.

² Rezultati testa občutljivosti za *gtr1Δ* na PA niso popolnoma jasni, saj je v enem poizkusu imela ta mutanta inhibirano rast tudi na gojišču z dodanim PA.

4.4.1 Mutante, ki se enako odzivajo na fenilacetat in na fenilbutirat

V testu z redčinami smo med testiranimi sevi identificirali štiri seve (*ent2Δ*, *yeh2Δ*, *war1Δ* in *mga2Δ*), ki so rastle počasneje kot divji sev na gojiščih z dodanim PA in PB. Iz tega lahko sklepamo, da (i) imata PA in PB zaradi strukturne podobnosti enak učinek na nekatere procese v celici ali (ii) da je učinek PB posledica delovanja njegovega metabolita PA. Za slednjo razlago bi pričakovali, da mutacije v genih, ki sodelujejo v procesu β -oksidacije in s tem omogočajo biotransformacijo PB v PA, povečajo rezistenco kvasovke na PB, kar pa ni v skladu z rezultati naših eksperimentov. V presejalnem testu s PB so imeli namreč sevi z izbitimi geni, katerih produkti so ključni v procesu β -oksidacije PB (glej poglavje 2.3.1), primerljivo rast z ostalimi sevi na gojišču s PB. Iz tega lahko zaključimo, da učinek PB na kvasovko ni posledica delovanja njegovega metabolita PA, pač pa imata obe substanci zaradi strukturne podobnosti podoben mehanizem delovanja ne nekatere procese celici. Prav tako lahko iz teh rezultatov sklepamo, da biotransformacija PB v PA ne prispeva bistveno k manjši toksičnosti PB. V presejalnem testu s PB smo identificirali samo dva gena (*ANT1* in *PEX28*), ki sta posredno vključena v β -oksidacijo in njuna delecija poveča občutljivost kvasovke na PB, kar pa nam s testom z redčinami ni uspelo potrditi.

4.4.1.1 PA in PB sta substrat Pdr12p transporterju

Rezultati testa z redčinami kažejo na to, da PB in PA sprožita v kvasovki odziv, ki je tipičen za šibke kisline. Kvasovka se na šibke kisline odziva s povečano transkripcijo *PDR12* gena, ki kodira zapis za membranski ABC transporter, s pomočjo katerega se črpajo iz citoplazme organski karboksilni anioni (Bauer in sod., 2003). Izražanje *PDR12* gena je v celici regulirano s transkripcijskim faktorjem War1p, ta se v prisotnosti kislinskih anionov in/ali zaradi spremembe pH aktivira, veže se na promotorsko mesto na *PDR12* genu in s tem poveča hitrost njegove transkripcije (Kren in sod., 2003). Iz rezultatov testa z redčinami je razvidno, da je sev *war1Δ* zelo občutljiv tako na PA kot na PB, kar nakazuje na to, da sta obe substanci substrat Pdr12p transporterju. Rezultati za sev *pdr12Δ* niso popolnoma jasni, saj je v presejalnem testu ta sev kazal povečano občutljivost na PB, v testu z redčinami pa je njegova rast na PB in PA primerljiva z rastjo divjega tipa. Tudi predhodne študije so pokazale povečano občutljivost seva *pdr12Δ* na PB, kar je v skladu z rezultati presejalnega testa, zato bi dodatno testiranje občutljivosti *pdr12Δ* seva na PA in PB dalo koristne informacije o pomenu Pdr12p transporterja za rezistenco kvasovke na PA in PB.

4.4.1.2 PA in PB inhibirata mevalonatno (MVA) biosintetsko pot v celici

V testu z redčinami so, izmed izbranih sevov, kazali povečano občutljivost na PA in PB (poleg *war1Δ*) še sevi *ent2Δ*, *yeh2Δ* in *mga2Δ*. Zanimivo je, da imajo vsi trije sevi izbite gene, katerih produkti sodelujejo v procesih povezanih z metabolizmom lipidov in vplivajo na fiziološko delovanje celičnih membran.

Ent1p in Ent2p sta homologa sesalskemu proteinu epsinu, ki ima pomembno funkcijo v endocitozi posredovani s klatrinom. Vežava liganda na receptor v plazemski membrani inducira tvorbo s klatrinom prekritih jamic. Klatrin se veže na citosolni del membrane in mehansko deformira membrano, nastane s klatrinom pokrit endocitozni mehurček, ki se loči od plazemske membrane (Wendland in sod., 1999). Oba proteina Ent1p in Ent2p imata vezavno mesto za klatrin, vendar njuna vloga v procesu endocitoze še ni popolnoma poznana. Študije so pokazale, da je delecija obeh genov (*ENT1* in *ENT2*)

za kvasovko usodna (Wendland in sod., 1999). Iz rezultatov presejalnega testa za PB je razvidno, da je mutanta *ent2Δ* zelo občutljiva na PB, pri mutanti *ent1Δ* pa nismo zaznali sprememb v rasti zaradi dodanega PB. S testom z redčinami smo potrdili občutljivost na PB za mutanto *ent2Δ* in pokazali, da delecija gena *ENT2* poveča občutljivost seva tudi na PA. Mutante *ent1Δ* nismo testirali s testom z redčinami.

Yeh2p katalizira reakcijo hidrolize sterolnih estrov v plazemski membrani kvasovke in ima pomembno vlogo v homeostazi sterolov, saj regulira razmerje med koncentracijami prostih sterolov in maščobnih kislin v celici (Mullner in sod., 2005). Steroli so esencialni lipidi v vseh evkariontskih celicah, kjer jih lahko najdemo kot proste sterole, ki jih je največ v plazemski membrani, ali pa se skladiščijo skupaj z maščobnimi kislinami kot sterolni estri v lipidnih telescih (Koffel in sod., 2005). Poleg Yeh2p sta poznani še dve hidrolazi sterolnih estrov v kvasovki *S. cerevisiae*, Yeh1p in Tgl1p, ki pa sta locirani v membrani lipidnih telesc (Koffel in sod., 2005). Vse tri hidrolaze sterolnih estrov, ki jih kodirajo *YEH1*, *YEH2* in *TGL1* geni, predstavljajo kvasne paraloge kislinskim lipazam v sesalcih (Koffel in sod., 2005). Študije so razkrile, da je Yeh2p edina hidrolaza sterolnih estrov, ki je locirana na plazemski membrani kvasovke (Mullner in sod., 2005), ter ima pomembno vlogo v hidrolizi sterolnih estrov, ki so zunaj celice ali privzeti z endocitozo (Koffel in sod., 2005). V presejalnem testu z 10 mM PB smo mutanto *yeh2Δ* identificirali kot občutljivo na PB, mutanti *yeh1Δ* in *tgl1Δ* pa sta na PB rastle primerljivo z ostalimi sevi. Rezultate za *yeh1Δ* in *yeh2Δ* smo potrdili tudi s testom z redčinami in pokazali, da se obe mutanti enako kot na PB odzivata tudi na PA. Seva *tgl1Δ* nismo testirali s testom z redčinami.

Mga2p in njegov funkcijski homolog Spt23p sta v neaktivni obliki locirana na membrani endoplazemskega retikuluma, različni okoljski dražljaji pa sprožijo njuno aktivacijo, ki je vezana na proteolitično cepitev dela proteina. Topna, aktivna fragmenta Mga2p ali Spt23p nato potujeta v celično jedro, kjer vplivata na regulacijo izražanja *OLE1* gena (Chellappa in sod., 2001; Shcherbik in sod., 2004). *OLE1* gen kodira zapis za acil-CoA-desaturazo, ki katalizira reakcijo pretvorbe nasičene stearinske kisline v enkrat nenasičeno oleinsko kislino. Delež nenasičenih maščobnih kislin v celici ima velik vpliv na fluidnost membrane, saj so nenasičene maščobne kisline pomemben gradnik bioloških membran (Chellappa in sod., 2001). Študije so pokazale, da se vlogi Mga2p in Spt23p v regulaciji izražanja *OLE1* gena dopolnjujeta. Med drugim so pokazali, da ima Mga2p velik vpliv predvsem na regulacijo stabilnosti mRNA *OLE1* transkripta (Kandasamy in sod., 2004), Spt23p pa deluje kot soaktivator transkripcije *OLE1* gena in negativni modulator Mga2p regulacije (Chellappa in sod., 2001). Vendar je še marsikaj v procesu procesiranja Mga2p in Spt23p, ter v procesu regulacije izražanja *OLE1* gena ostalo nepojasnjenega. V presejalnem testu z 10 mM PB je imel sev *mga2Δ* inhibirano rast v primerjavi z drugimi sevi na PB, sev *spt23Δ* pa je rastle primerljivo z ostalimi sevi na PB. S testom z redčinami smo potrdili povečano občutljivost mutante *mga2Δ* na PB in pokazali, da je ta mutanta zelo občutljiva tudi na PA. Seva *spt23Δ* nismo dodatno testirali s testom z redčinami.

Rezultati naših eksperimentov kažejo na to, da imajo geni *ENT2*, *YEH2* in *MGA2* velik pomen za rast kvasovke na PB in PA. Predhodne študije so razkrile, da fenilne in fenolne kisline, med katere sodita tudi PA in PB, delujejo v celici kot kompetitivni inhibitorji encima pirofosfomevalonat-dekarboksilaze, ki je vključen v mevalonatno (MVA) metabolno pot (Berges in sod., 1997; Sama Bhat in Ramsarma, 1978; Hudgins in sod., 1995). V MVA metabolni poti se biosintetizirajo biološko zelo pomembne molekule, kot ubikvinon, hormoni (v sesalskih celicah), prenilne skupine nekaterih membranskih proteinov (na primer G proteinov) in steroli (Berges in sod., 1997; Hudgins in sod., 1995). Eden najpomembnejših produktov MVA poti je pri kvasovki

ergosterol in pri živalih holesterol. Ergosterol je v kvasni celici pomembna komponenta membran in ima velik vpliv predvsem na njihovo fluidnost in permeabilnost. Mutacije v genih, ki so vključeni v biosintezo ergosterola, povzročijo nepravilnosti v procesu endocitoze (Heese-Peck in sod., 2002), kar razloži povečano občutljivost za seva *ent2Δ* in *yeh2Δ* na PA in PB. Kot smo že opisali zgoraj, sta oba izbita gena mutant, *ENT2* in *YEH2*, neposredno povezana s procesom endocitoze, Yeh2p pa je poleg tega tudi ključni encim v regulaciji deleža sterolov v celični membrani. PA in PB torej verjetno v celici inhibirata biosintezo sterolov, kar ima velik vpliv na fiziološke lastnosti celičnih membran in s tem na proces endocitoze. Mutacije v genih, katerih produkti so vključeni v proces endocitoze, še dodatno oslabijo celoten proces, zato te mutante rastejo počasneje na gojišču z dodanim PA ali PB.

Z učinkom PA in PB na manjšo sintezo sterolov v celici lahko razložimo tudi povečano občutljivost mutante *mga2Δ* na PA in PB. Mga2p in njegov funkcijski homolog Spt23p sta pomembna v regulaciji sinteze nenasičenih maščobnih kislin, ki so poleg sterolov pomembne komponente celičnih membran. Vendar so predhodne študije pokazale, da imata Spt23p in Mga2p enako raven aktivnosti v procesu regulacije izražanja *OLE1* gena, kadar kvasovka raste na glukozi (Chellappa in sod., 2001). Zato bi za potrditev te razlage pričakovali, da bo tudi mutanta *spt23Δ*, podobno kot *mga2Δ*, rastla počasneje na bogatem YPD gojišču, ki smo mu dodali PB, kar pa ni v skladu z rezultati presejalnega testa. Ker PA in PB vplivata na povečano občutljivost samo *mga2Δ* seva lahko predpostavimo, da obe substanci inhibirata delovanje njegovega funkcijskega homologa Spt23p. Shcherbik in sod. (2004) so z eksperimenti pokazali, da je za aktivacijo Spt23p esencialna ubikvitin-ligaza Rsp5p, ki pa nima pomembnega vpliva na procesiranje Mga2p. Iz tega bi lahko sklepali, da PA in PB mogoče inhibirata delovanje Rsp5p. Rsp5p je filogenetsko zelo ohranjena ubikvitin-ligaza, ki ima pomembno vlogo tudi v regulaciji aktivnosti številnih proteinov, vključno plazemskih permeaz in transporterjev (Shcherbik in sod., 2004). Zanimivo je, da so predhodne študije pokazale povezavo med deležem ergosterola in procesom ubikvitinacije v kvasovki (Umebayashi, 2003). Lipidni rafti (angl. »lipid rafts«), to so membranske mikrodomene, bogate s steroli in sfingolipidi, imajo namreč velik vpliv na pravilno vezavo ubikvitina s pomočjo Rsp5p (na primer na triptofan-permeazo Tat2p) in s tem na pravilno sortiranje proteinov v vakuolo (za razgradnjo) ali za vgradnjo v plazemsko membrano (Umebayashi in Nakano, 2003). Iz tega bi lahko sklepali, da je mogoče tudi ubikvitinacija neaktivnega Spt23p s pomočjo Rsp5p vezana na lipidne mikrodomene na membrani endoplazmatskega retikuluma, kar pa ni bilo še dokazano. Vsekakor bi to pomenilo, da PB in PA zaradi inhibicije MVA poti vplivata na aktivnost Rsp5p in s tem na procesiranje Spt23p ter na aktivnost nekaterih membranskih proteinov. Ta razlaga bi bila tudi v skladu s predhodnimi študijami delovanja PB na nekatere plazemske transporterje (Lui in sod., 2004), prav tako je konsistentna z rezultati presejalnega testa s PB, ker smo identificirali kar nekaj genov, ki so vključeni v proces ubikvitinacije.

Inhibicija mevalonatne metabolne poti vpliva tudi na manjšo aktivnost nekaterih G proteinov, na primer Ras proteinov (Dimster-Denk in sod., 1994; Hudgins in sod., 1995). Veliko proteinov, vključenih v signaliziranje, se postranslacijsko modificira s kovalentno vezavo prenilne skupine, ki omogoča zasidranje proteina v plazemsko membrano (Dimster-Denk in sod., 1994). Prenilne skupine pa so eden izmed produktov mevalonatne biosintetske poti. Predhodne študije so pokazale, da PB in PA inhibirata proces vezave prenilnih skupin in na ta način zmanjšata delež aktivnih Ras proteinov, ki inducirajo rast nekaterih tumorskih celic (Dimster-Denk in sod., 1994). To je tudi konsistentno z rezultati analize kemijsko-genetskega profila za PB, iz katerih je razvidno, da ima PB velik vpliv na celično signaliziranje v kvasovki (glej poglavje 4.3.1.4).

Rezultati naših eksperimentov kažejo na to, da je učinek delovanja PB in PA v kvasovki najverjetneje predvsem posledica inhibicije mevalonatne metabolne poti. Ker inhibirata rast kvasnih celic v mM koncentracijah lahko sklepamo, da se ne vežeta ireverzibilno na določen encim v celici, ampak je njun učinek posledica kompeticije z naravnimi substrati za vezalna mesta encimov.

4.4.2 Mutante, ki se specifično odzivajo samo na fenilbutirat

S testom z redčinami smo pokazali, da se nekatere delecije mutante odzivajo samo na PB, ne pa tudi na PA. To pomeni, da ima PB specifičen vpliv na določene procese v kvasovki. Predhodne študije so razkrile, da nekatere kratkoveržne maščobne kisline inhibirajo histonske deacetilaze in na ta način vplivajo na izražanje nekaterih genov v celici (Hinnebusch in sod., 2002). Eksperimenti kažejo, da imajo butirat in njegovi analogi, med katere sodi tudi PB, najmočnejši vpliv na inhibicijo histonskih deacetilaz, acetat in njegovi analogi pa imajo na acetilacijo histonov zelo majhen učinek (Hinnebusch in sod., 2002). Znano je tudi, da PB sproži v celici stresni odziv, ki se kaže med drugim v povečani sintezi stresnih proteinov (Wright in sod., 2003).

Zanimivo je, da smo s testom z redčinami potrdili povečano rezistenco na PB za seva *zuo1Δ* in *ssz1Δ*. Kot smo že opisali v poglavju 4.3.1.1 sta Zuo1p in Ssz1p funkcijsko zelo povezana, saj tvorita skupni RAC kompleks, ki se veže z ribosomi in ima tako pomembno funkcijo v procesu nastajanja proteinov. Oba gena sta evolucijsko zelo ohranjena od bakterij do človeka in imata poznana homologa v človeku (Huang in sod., 2005). S testom z redčinami smo potrdili vpliv PB na proces translacije, predvsem pa na zvižanje novo sintetiziranih proteinov.

Rezultati testa z redčinami so potrdili občutljivost na PB za seve *izh3Δ*, *gtr1Δ*, *kin1Δ* in kažejo, da PA nima vpliva na rast teh mutant. Izh3p je v kvasovki član družine paralognih membranskih proteinov Izh1-4p, ki sodijo v evolucijsko ohranjeno skupino membranskih steroidnih ali adiponektinskih receptorjev (Lyons in sod., 2003). Izh proteini imajo v kvasovki pomembno vlogo v vzdrževanju homeostaze nekaterih kationov (predvsem Zn^{2+}), vključeni so v sintezo steroidov ter povezani s procesi celičnega signaliziranja. Študije so pokazale, da je ekspresija *IZH* genov regulirana s koncentracijo maščobnih kislin zunaj celice, s koncentracijo Zn^{2+} v celici ali preko sensorja Mga2p (Lyons in sod., 2003). Prav tako so z eksperimenti pokazali, da se posamezni *IZH* geni različno izražajo zaradi delovanja teh faktorjev, tako je zaradi napak v biosintetski poti ergosterola transkripcija *IZH3* gena inducirana, *IZH4* gena pa inhibirana (Lyons in sod., 2003). Iz tega bi lahko sklepali, da je lahko občutljivost *izh3Δ* mutante na PB posledica manjše sinteze ergosterola v kvasovkah. Vendar bi za tako razlago pričakovali, da bo sev *izh3Δ* občutljiv tudi na PA, ki tudi inhibira biosintezo sterolov v celici, česar pa naši eksperimenti niso potrdili. To pomeni, da ima PB vpliv na proces(e) v celici, na katere PA nima vpliva, in da so le-ti povezani z aktivnostjo Izh3p. Vendar, ker je še marsikaj v zvezi z delovanjem Izh proteinov nepojasnjeno in ker iz dostopne literature nismo dobili nobenih informacij o delovanju PB na Izh proteine, ne znamo napovedati, kakšen je mehanizem delovanja PB na adiponektinske receptorje v kvasovki. Vsekakor pa je iz naših rezultatov razvidno, da je *IZH3* gen pomemben za rast kvasovke na PB, kar je lahko v povezavi z učinkovitim zdravljenjem diabetesa tipa 2 s PB, saj je delovanje adiponektinskih receptorjev ključno pri zdravljenju te bolezni (Ozcan in sod., 2006; Wikipedia. Adiponectin..., 2006).

Rezultati naših eksperimentov kažejo na to, da je mutanta *gtr1Δ* zelo občutljiva na PB. Iz priloge D je tudi razvidno, da rezultati za PA niso popolnoma jasni. Sev *gtr1Δ* smo namreč testirali trikrat, v enem poizkusu je imela ta mutanta močno inhibirano rast na gojišču s PA, v ostalih dveh poizkusih pa je bila rast mutante na PA primerljiva z rastjo divjega seva. Gtr1p je citoplazmatski GTPazni protein in negativen regulator Ran/Tc4 cikla, preko katerega poteka transport makromolekul med jedrom in citosolom v celici. Todaka in sod. (2005) so pokazali, da je Gtr1p vključen tudi v proces združevanja RNA polimeraze I in III, ki sintetizirata prekurzorje rRNA in tRNA. Pokazali so, da mutacije *GTR1* gena vplivajo na manjšo biogenezo ribosomov. To mogoče pomeni, da je občutljivost *gtr1Δ* seva na PB povezana z delovanjem PB na proces translacije, kar so potrdili tudi rezultati testiranja za seva *zuo1Δ* in *ssz1Δ*.

Sev *kin1Δ* je v testu z redčinami tudi rasel počasneje na gojišču s PB, na gojišču s PA pa ni imel inhibirane rasti v primerjavi z divjim sevom. Kin1p je protein s kinazno aktivnostjo, lociran na plazemski membrani in vključen v regulacijo eksocitoze. Iz znanih podatkov iz literature in iz rezultatov naših eksperimentov ne znamo napovedati, zakaj so mutante *izh3Δ*, *gtr1Δ* in *kin1Δ* občutljive specifično na PB. Gtr1p in Kin1p sta povezana s procesom prenašanja fosfatnih skupin v celici in z razmerjem AMP/ATP oziroma GMP/GTP. V normalnih pogojih, ko ima celica na razpolago dovolj hranil je to razmerje nizko, različni stresorji pa vplivajo na povečano razmerje AMP/ATP, saj so popravljalni mehanizmi v celici, na katero deluje stresor, energetsko zelo potratni (Hardie, 2003). Znano pa je, da povišano razmerje AMP/ATP inducira aktivacijo AMPK (angl. »AMP-activated protein kinase«), ki sproži kaskado različnih metabolnih sprememb v celici (Hardie, 2003). AMPK poveča delež razpoložljive energije v celici z inhibicijo biosintetskih, energetsko potratnih poti (sinteza sterola, proteinov, izoprenoidov...) in stimulira katabolne reakcije (oksidacija maščobnih kislin, transport glukoze...), poleg tega AMPK vpliva na izražanje številnih genov (Hardie, 2003). PB tudi sproži v celici močan stresni odziv, saj se koncentracije stresnih proteinov močno povečajo zaradi delovanja PB (Wright in sod., 2003), zato lahko predpostavimo, da PB v kvasovki poveča aktivnost Snf1p, ki je v kvasovki homolog sesalskemu AMPK. Zanimivo je še, da se AMPK aktivira med drugim tudi z adiponektinskimi receptorji (Hardie, 2003), kar je lahko v povezavi s povečano občutljivostjo *izh3Δ* seva na PB. Znano je tudi, da imajo nekatera zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje diabetesa tipa 2, velik vpliv na aktivacijo AMPK (Hardie, 2003), kar bi tudi lahko pojasnilo blagodejni vpliv PB na zdravljenje diabetesa tipa 2 (Ozcan in sod., 2006).

Iz vsega navedenega lahko predpostavljamo, da so Gtr1p, Kin1p in Izh3p potrebni za rast kvasovke na PB mogoče tudi zaradi stresnega odziva celice na PB. Iz dostopne literature nismo dobili informacije o stresnem odzivu celice na PA. Znano je, da je v zelo nizkih koncentracijah (nekaj μM) PA vedno prisoten v celici kot metabolit fenilalanina, zato mogoče v celici ne sproži tako močnega stresnega odziva kot PB, saj ga celice ne zaznajo kot ksenobiotik. Vsekakor so to samo domneve, ki pa bi jih bilo potrebno podkrepiti z dodatnimi biokemijskimi analizami.

Specifični učinek PB na rast nekaterih mutant je lahko tudi posledica inhibicije histonskih deacetilaz in s tem spremenjene ekspresije nekaterih genov (Hinnebusch in sod., 2002). Kot smo omenili že v začetku poglavja, ima PB precej večji vpliv na inhibicijo histonskih deacetilaz kot PA, vendar nam tega z uporabljenimi analiznimi metodami ni uspelo potrditi. Prav tako ne smemo zanemariti možnosti, da ima lahko PB v celici še kakšne druge, nepoznane tarče.

5 ZAKLJUČKI

V diplomskem delu smo za analizo mehanizmov delovanja PB, PA in nikotina uporabljali novejšo metodo s področja genomike, kemijsko-genomsko analizo. Metoda temelji na primerjavi fenotipov (rasti) delecijjskih mutant kvasovke *S. cerevisiae* na gojišču z dodano testno kemikalijo in na kontrolnem gojišču, brez kemikalije. Pri našem delu smo za testiranje rasti uporabili zbirko delecijjskih haploidnih mutant, kjer ima vsak sev sistematično izbit en neesencialni gen. Kot vsaka metoda ima tudi slednja nekatere prednosti in pomanjkljivosti.

Pomanjkljivosti kemijsko-genomske analize:

- Interpretacijo rezultatov kemijsko-genomske analize otežuje trenutno pomanjkljivo poznavanje bioloških vlog genov in sintetsko-genetskih interakcij. Tako je med identificiranimi geni kemijsko-genomske analize za PB in nikotin okrog 25% genov z nepoznano funkcijo (**priloga A in C**). Še bolj pomanjkljivo je poznavanje in razumevanje sintetsko-genetskih interakcij, saj je trenutno poznanih le okrog 2-4% interakcij med geni (Tong in sod., 2004). Predhodne raziskave so razkrile, da ima posamezni gen lahko tudi do 145 različnih interakcij z ostalimi geni v celici (Tong in sod., 2004), kar še dodatno otežuje interpretacijo rezultatov iz kemijsko-genetskega profila.
- Metoda je primerna za analizo molekularnih mehanizmov delovanja kemikalije z vsaj delno poznanimi učinki na celične procese, saj so za interpretacijo rezultatov kemijsko-genetskega profila te kemikalije v veliko pomoč informacije predhodnih študij vpliva te substance na procese v celici. Tako je bila interpretacija rezultatov za PB in PA lažja zaradi številnih predhodnih študij delovanja PB in PA. Zelo malo pa je znanega o nereceptorskem delovanju nikotina na celice, saj večina raziskav z nikotinom temelji na njegovem delovanju na nikotinski acetilholinski receptor. Še manj pa je znanega o farmakokinetiki in farmakodinamiki nikotina v kvasni celici.
- Nepoznana zanesljivost metode zaradi sistematičnih napak, na primer zaradi neznanih, nezaželenih mutacij, ki lahko nastanejo pri sistematičnem izbitju želenega gena in lahko tudi vplivajo na spremenjeno rast kvasovke na testni kemikaliji (Brenner, 2004).
- Nepoznana občutljivost metode: primerjava rezultatov kemijsko-genomske analize, testa z redčinami in Bioscreen rastnih krivulj (Petrovič, neobjavljeni podatki) nam kaže, da je metoda bolj občutljiva kot test z redčinami, kar pa bi bilo treba še dodatno potrditi. Vsekakor bi bilo, zaradi večje zanesljivosti rezultatov, potrebno presejalni test za vsako kemikalijo večkrat ponoviti.
- Nimamo podatkov za esencialne gene, s testiranjem haploidnih mutant ne moremo identificirati esencialnih genov, ki poleg neesencialnih, tudi mogoče vplivajo na rast kvasovke na testni kemikaliji.

Prednosti kemijsko-genomske analize:

- Metoda je hitra, enostavna in ne zahteva veliko laboratorijskih izkušenj ter predznanja.
- Za interpretacijo rezultatov so preko spleta dostopne bogate in ažurirane zbirke s podatki o kvasnih genih, proteinih ter znanih interakcijah le-teh in omogočajo dostop do nekaterih orodij za analizo genetskih podatkov, s pomočjo katerih je interpretacija rezultatov iz kemijsko-genomske analize lažja.
- S to metodo testiramo kemikalijo *in vivo*, saj omogoča identifikacijo interakcij med kemikalijo in biološkimi molekulami v njihovem naravnem okolju - celici.
- Presejalni test lahko večkrat ponovimo in ga razširimo, na primer s spreminjanjem nekaterih zunanjih pogojev, kot je vir ogljika, hranil, pH... Primerjava kemijsko-

- genetskih profilov za isto substanco pri drugačnih pogojih nam lahko nudi dodatne, koristne informacije za analiziranje mehanizmov delovanja te kemikalije v celici.
- Zaradi evolucijske ohranjenosti številnih identificiranih genov v tej metodi, je kemijsko-genomska analiza primerna metoda tudi za identifikacijo tarč delovanja PB, PA in nikotina na višje organizme (človeka). Med geni kemijsko-genetskih profilov za PB, PA in nikotin je veliko genov, ki imajo poznane homologe v človeku, kar omogoča ekstrapolacijo dobljenih rezultatov tudi na človeka.
 - Nenazadnje je tu še ekonomski faktor: metoda je privlačna tudi z ekonomskega stališča, saj ne zahteva uporabe dragih analiznih inštrumentov ali kemikalij.

Iz rezultatov eksperimentalnega dela, kjer smo testirali rast delecijских mutant kvasovke na PB, PA in nikotinu, in iz analize teh rezultatov bi lahko strnili naslednje zaključke:

- Dokazali smo, da je PB bolj toksičen za kvasovko kot PA (**slika 4.1**): PB inhibira rast kvasovk že v 5 mM koncentraciji, inhibitorne koncentracije PA pa so za kvasovko precej višje (100 mM). Sklepamo, da je vzrok za večjo toksičnost PB predvsem večja hidrofobnost in manjša stopnja ionizacije v primerjavi s PA, ter specifično delovanje PB na nekatere procese v celici. Rezultati kažejo, da je za izločanje PB in PA iz kvasovke pomemben Pdr12p transporter.
- Nikotin inhibira rast kvasnih celic v 10 mM koncentraciji (**Slika 4.2**) in je kar 1000 krat manj toksičen za kvasovko kot za človeka. Vzrok je predvsem nevrotoksičen učinek nikotina na višje organizme zaradi inhibicije nikotin-acetilholinskega receptorja, delno pa tudi večja stopnja ionizacije nikotina v kislem kvasnem mediju. Med rezultati kemijsko-genetskega profila za nikotin nismo identificirali nobenega transporterja, ki bi bistveno prispeval k manjši toksičnosti nikotina za kvasovke in bi tako tudi delno razložil višje inhibitorne koncentracije nikotina za kvasovke.
- Vse tri testne substance inhibirajo rast kvasovk v mM koncentracijah, iz tega lahko sklepamo, da je njihova inhibicija verjetno posledica kompeticije s celičnimi molekulami za vezavna mesta na encimih. Prav tako je iz rezultatov razvidno, da imajo vse tri substance vpliv na različne procese v celici, kar kaže na nespecifičnost njihovega delovanja.
- Analiza rezultatov presejalnega testa za PB je pokazala, da so za kvasovko, ki raste na gojišču s PB, pomembni predvsem procesi metabolizma organskih kislin, tvorbe membranskih veziklov, sinteza aromatskih AK ter celično signaliziranje.
- Rezultati testiranja sevov z izbitimi geni, ki so ključni za biotransformacijo PB v PA kažejo na to, da delovanje PB na kvasovko ni posledica delovanja njegovega metabolita PA in da proces β -oksidacije ne prispeva veliko k manjši toksičnosti PB za kvasno celico.
- PB in PA imata verjetno zaradi strukturne podobnosti podoben učinek na nekatere biološke procese. Rezultati naših eksperimentov kažejo na to, da je učinek delovanja PB in PA v kvasovki predvsem posledica inhibicije mevalonatne metabolne poti, v kateri se sintetizirajo nekatere biološko zelo pomembne molekule kot so steroli, prenilne skupine in ubikvinon (Berges in sod., 1997; Hudgins in sod., 1995).
- Nekatere delecijske mutante se specifično odzivajo samo na PB, kar kaže na to, da ima PB še druge tarče v kvasovki, na katere PA nima učinka. Pokazali smo vpliv PB na proces translacije, predvsem na zvižanje novo sintetiziranih proteinov. Specifičen odziv nekaterih sevov na PB je lahko tudi posledica močnega stresnega odziva celice na PB. Uporabljene analizne metode pa nam ne omogočajo potrditve vpliva PB na ekspresijo nekaterih genov zaradi povečane acetilacije histonov ali identifikacijo tarč, na katere ima morebiti PB tudi specifični učinek v kvasovki.

- Analiza rezultatov presejalnega testa za nikotin je pokazala, da so za rast kvasovke na nikotinu pomembni predvsem procesi, ki so povezani z metabolizmom koencimov in z vzdrževanjem telomer. To potrjuje aktivno vlogo nikotina pri nastanku nekaterih rakastih obolenj, zaradi njegovega delovanja na telomerazno aktivnost (Targowski in sod., 2005), in učinek nikotina na nekatere procese v celici, zaradi njegove strukturne podobnosti z nikotinamidom (Chang. Nicotinamide..., 2004).

Za nadaljnje testiranje in analizo mehanizmov delovanja PB in PA bi predlagali, da se presejalni test ponovi vsaj še 3-krat za obe substanci, pri čemer bi bilo potrebno za PA uporabiti višje koncentracije, poleg tega bi bilo potrebno gojišče ustrezno zakisati in mu dodati pufer. Na ta način bi iz rezultatov kemijsko-genetskega profila izločili predvsem seve, ki so v posameznem testiranju lažno pozitivni. S pufrom in s konstantno vrednostjo pH medija pa bi zagotovili boljšo ponovljivost presejalnega testa. Z dodatnim testiranjem kvasovk pri spremenjenih pogojih (drugačen pH, uporaba nefermentativnega vira ogljika, anoksični pogoji, spremenjena temperatura...) pa bi lahko pridobili še dodatne informacije o delovanju PA in PB na procese v kvasovki. Predvsem bi na ta način lahko identificirali nekatere zmed mutant, ki se odzivajo na PA in/ali PB v specifičnih pogojih.

Menimo, da je kvasovka primeren modelni organizem za identifikacijo nереceptorskih tarč nikotina, saj je med identificiranimi geni, ki blažijo učinek nikotina na kvasovko, kar nekaj takih, ki so evolucijsko zelo ohranjeni. Nikotin naj bi med drugim inhibiral celično dihanje (Quink, 2004), kar potrjujejo tudi naši rezultati presejalnega testa z nikotinom. Za potrditev te hipoteze je kvasovka idealen organizem, saj omogoča (z uporabo različnih virov ogljika) testiranje vpliva kemikalije na mitohondrijske proteine, ki so ključni za respiracijo. Zato bi za nadaljnjo analizo molekulskega delovanja nikotina predlagali, da se presejalni test za nikotin ponovi vsaj 3-krat z uporabo fermentativnega in nefermentativnega vira ogljika pri konstantnih pogojih (pH gojišča). Ker imajo kemikalije s podobnim biološkim učinkom podobne kemijsko-genetske profile (Parsons in sod., 2006), bi bila za interpretacijo rezultatov kemijsko-genetskega profila za nikotin koristna tudi primerjava profilov substanc s podobnim učinkom (na primer za neonikotinoide).

6 VIRI

5.1 ČLANKI V REVIJAH

1. Akache B., MacPherson S., Sylvain M.A., Turcotte B. Complex Interplay Among Regulators of Drug Resistance Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 27855–27860
2. Arvanitidis A., Heinisch J.J. Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by *in vitro* mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 8911–8918
3. Baetz K., McHardy L., Gable K., Tarling T., Reberieux D., Bryan J., Andersen R.J., Dunn T., Hieter P., Roberge M. Yeast genome-wide drug-induced haploinsufficiency screen to determine drug mode of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 4525–4530
4. Bauer B.E.1, Rossington D., Mollapour M., Mamnun Y., Kuchler K., Piper P.W. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *European Journal of Biochemistry* 270 (2003) 3189–3195
5. Beck T., Schmidt A., Hall M.N. Starvation Induces Vacuolar Targeting and Degradation of the Tryptophan Permease in Yeast. *The Journal of Cell Biology* 146, 6 (1999) 1227–1237
6. Berges T., Guyonnet D., Karst F. The *Saccharomyces cerevisiae* Mevalonate Diphosphate Decarboxylase Is Essential for Viability, and a Single Leu-to-Pro Mutation in a Conserved Sequence Leads to Thermosensitivity. *Journal of Bacteriology* 179, 15 (1997) 4664–4670
7. Bernstein B.E., Tong J.K., Schreiber S.L. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Genetic Chemistry* 25 (2000) 13708–13713
8. Botstein D., Chervitz S.A., Cherry M. Yeast as a model organism. *Science* 277 (1997) 1259–1260
9. Braga-Basaria M., Ringel M.D. Beyond Radioiodine: A Review of Potential New Therapeutic Approaches for Thyroid Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 5 (2003) 1947–1960
10. Braus G.H. Aromatic Amino Acid Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Model System for the Regulation of a Eukaryotic Biosynthetic Pathway. *Microbiological Reviews* (1991) 349–370
11. Brenner C. Chemical genomics in yeast. *Genome Biology* 5 (2004), 240
12. Brown J.A., Sherlock G., Myers C.L., Burrows N.M., Deng C., Wu H.I., McCann K.E., Troyanskaya O.G., Brown J.M. Global analysis of gene function in yeast by quantitative phenotypic profiling. *Molecular Systems Biology* 2 (2006) 1–9
13. Chellappa R., Kandasamy P., Oh C.S., Jiang Y., Vemula M., Martin C.E. The Membrane Proteins, Spt23p and Mga2p, Play Distinct Roles in the Activation of *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 47 (2001) 43548–43556
14. Dimster-Denk D., Schafer W.R., Rinett J. Control of RAS mRNA Level by the Mevalonate Pathway. *Molecular Biology of the Cell* 6 (1995) 59–70
15. Dolinski K., Muir S., Cardenas M., Heitman J. All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 13093–13098
16. Fisk D.G., Ball C.A., Dolinski K., Engel S.R., Hong E.L., Issel-Tarver L., Schwartz K., Sethuraman A., Botstein D., The *Saccharomyces* Genome Database Project. *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast* 23 (2006) 857–865
17. Giaever G., Flaherty P., Kumm J., Proctor M., Nislow C., Jaramillo D.F., Chu A.M., Jordan M.I., Arkin A.P., Davis R.W. Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 793–798.
18. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. Abstract - Life with 6000 Genes. *Science* 274 (1996)

19. Goossens A., Hakkinen S.T., Laakso I., Oksman-Caldentey K.M., Inze D. Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures. *Plant Physiology* 131 (2003) 1161–1164
20. Grzanowski A., Needleman R., Brusilow W.S.A. Immunosuppressant-like effects of phenylbutyrate on growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 41 (2002) 142–149
21. Hamilton J.A. Fatty acid transport: difficult or easy? *Journal of Lipid Research* 39 (1998) 467-481
22. Hardie G. Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade : The Key Sensor of Cellular Energy Status. *Endocrinology* 144, 12 (2003) 5179–5183
23. Harrison P.M., Kumar A., Lang N., Snyder M., Gerstein M. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Research* 30, 5 (2002) 1083–1090
24. Hecht S.S., Hochalter J.B., Villalta P.W., Murphy S.H. 2-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: Formation of a lung carcinogen precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 23 (2000) 12493–12497
25. Heese-Peck A., Pichler H., Zanolari B., Watanabe R., Daum G., Riezman H. Multiple Functions of Sterols in Yeast Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 13 (2002) 2664–2680
26. Hinnebusch B.F., Meng S., Wu J.T., Archer S.Y., Hodin R.A. The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation. *The Journal of Nutrition* 132 (2002) 1012-1017
27. Hirschman J.E., Balakrishnan R., Christie K.R., Costanzo M.C., Dwight S.S., Engel S.R., Fisk D.G., Hong E.L., Livstone M.S., Nash R., Park J., Oughtred R., Skrzypek M., Starr B., Theesfeld C.L., Williams J., Andrada R., Binkley G., Dong Q., Lane C., Miyasato S., Sethuraman A., Schroeder M., Thanawala M.K., Weng S., Dolinski K., Botstein D., Cherry J.M. Genome Snapshot: a new resource at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) presenting an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic Acids Research* 34 (2006) 442-445
28. Huang P., Gautschi M., Walter W., Rospert S. The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nature Structural and Molecular Biology* 12 (2005) 498-504
29. Hudgins W.R., Shack S., Myers C.E., Samid D. Cytostatic activity of phenylacetate and derivatives against tumor cells. Correlation with lipophilicity and inhibition of protein prenylation. *Biochemical Pharmacology* 50, 8 (1995) 1273-1279
30. Hughes T. R. Abstract - Yeast and drug discovery. *Functional & Integrative Genomics* 2 (2002) 199–211
31. Hukkanen J., Jacob P. 3rd, Benowitz N.L. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacological Reviews* 57, 1 (2005) 79-115
32. Kandasamy P., Vemula M., Oh C.S., Chellappa R., Martin C.E. Regulation of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in *Saccharomyces*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 35 (2004) 36586–36592
33. Kang H.L., Benzer S., Min K.T. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2 (2002) 838–843
34. Kasumov T., Brunengraber L.L., Comte B., Puchowicz M.A., Jobbins K., Thomas K., David F., Kinman R., Wehrli S., Dahms W., Kerr D., Nissim I., Brunengraber H. New secondary metabolites of phenylbutyrate in humans and rats. *Drug Metabolism and Disposition* 1 (2004) 10-19
35. Koffel R., Tiwari R., Falquet L., Schneiter R. The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 Genes Encode a Novel Family of Membrane-Anchored Lipases That Are Required for Steryl Ester Hydrolysis. *Molecular and Cellular Biology* 25, 3 (2005) 1655–1668
36. Kren A., Mamnun Y.M., Bauer B.E., Schuller C., Wolfger H., Hatzixanthis K., Mollapour M., Gregori C., Piper P., Kuchler K. War1p, a Novel Transcription Factor Controlling Weak Acid Stress Response in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5 (2003) 1775-1785
37. Lee T.I., Rinaldi N.J., Robert F., Odom D.T., Joseph Z.B., Gerber G.K., Hannett N.M., Harbison C.T., Thompson C.M., Simon I., Zeitlinger J., Jennings E.G., Murray H.L., Gordon D.B., Ren B., Wyrick J.J., Tagne J.B., Volkert T.L., Fraenkel E., Gifford D.K., Young R.A.

- Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298 (2002) 799-804
38. Liu M., Brusilow W.S.A., Needleman R. Activity of the yeast Tat2p tryptophan permease is sensitive to the anti-tumor agent 4-phenylbutyrate. *Curr Genet* 46 (2004) 256–268
 39. Lockshon D., Surface L.E., Kerr E.O., Kaeberlein M., Kennedy B.K. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 175 (2007) 77-91
 40. Lyons T.J., Villa N.Y., Regalla L.M., Kupchak B.R., Vagstad A., Eide D.J. Metalloregulation of yeast membrane steroid receptor homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 15 (2004) 5506–5511
 41. Marks P.A., Richon V.M., Rifkind R.A. Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 15 (2000) 1210-1216
 42. Marton M.J., Derisi J.L., Bennett H.A., Iyer V.R., Meyer M.R., Roberts C.J., Stoughton R., Burchard J., Slade D., Dai H., Bassett Jr D.E., Hartwell L.H., Brown P.O., Friend S.H. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nature Medicine* 11 (1998) 1293-1301
 43. Mullner H., Deutsch G., Leitner E., Ingolic E., Daum G. *YEH2/YLR020c* Encodes a Novel Steryl Ester Hydrolase of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of the Biological Chemistry* 280, 14 (2005) 13321–13328
 44. Nakashima N., Noguchi E., Nishimoto T. *Saccharomyces cerevisiae* Putative G Protein, Gtr1p, Which Forms Complexes With Itself and a Novel Protein Designated as Gtr2p, Negatively Regulates the Ran/Gsp1p G Protein Cycle Through Gtr2p. *Genetics* 152 (1999) 853–867
 45. Ohba M. Modulation of intracellular protein degradation by SSB1-SIS1 chaperon system in yeast *S. cerevisiae*. *FEBS Letters* 409, 2 (1997) 307-311
 46. Ozcan U., Yilmaz E., Ozcan L., Furuhashi M., Vaillancourt E., Smith R.O., Gorgun C.Z., Hotamisligil G.S. Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science* 313 (2006) 1137-1140
 47. Parsons A.B., Brost R.L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G.W., Kane P.M., Hughes T.R., Boone C. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nature Biotechnology* 22 (2004) 62–69
 48. Parsons A.B., Geyer R., Hughes T.R., Boone C. Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Progress in Cell Cycle Research* 5 (2003) 159-166
 49. Parsons A.B., Lopez A., Givoni I.E., Williams D.E., Gray C.A., Porter J., Chua G., Sopko R., Brost R.L., Ho C.H., Wang J., Ketela T., Brenner C., Brill J.A., Fernandez G.E., Lorenz T.C., Payne G.S., Ishihara S., Ohya Y., Andrews B., Hughes T.R., Frey B.J., Graham T.R., Andersen R.J., Boone C. Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell* 126 (2006) 611–625
 50. Petrovič U., Mattiazzi M., Curk T., Zupan B., Igor Križaj I. Od genomike k fenomiki: kaj se lahko naučimo od modelnih organizmov in kakšna orodja bioinformatike potrebujemo. Prvo srečanje slovenskih bioinformatikov, Ljubljana 2005
 51. Quik M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 27 (2004) 561-568
 52. Rubstein R.C., Lyons B.M. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281 (2001) L43–L51
 53. Shama Bhat C., Ramasarma T. Inhibition of Rat Liver Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase and Mevalonate Phosphate Kinase by Phenyl and Phenolic Compounds. *Biochemistry Journal* 181 (1979) 143-151
 54. Shcherbik N., Kee Y., Lyon N., Huibregtse J.M., Haines D.S. A Single PXY Motif Located within the Carboxyl Terminus of Spt23p and Mga2p Mediates a Physical and Functional Interaction with Ubiquitin Ligase Rsp5p. *The Journal of Biological Chemistry* 297, 51 (2004) 53892–53898
 55. Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymology* 350 (2002) 3-41.
 56. Staley J.P., Guthrie C. Mechanical Devices of the Spliceosome : Motors, Clocks, Springs, and Things- Review. *Cell* 92 (1998) 315–326

57. Stevens S.W., Ryan D.E., Ge H.Y., Moore R.E., Young M.K., Lee T.D., Abelson J. Composition and Functional Characterization of the Yeast Spliceosomal Penta-snRNP. *Molecular Cell* 9 (2002) 31–44
58. Targowski T., Jahnz-Rózyk K., Szkoda T., From S., Rozyńska R., Plusa T. Abstract-Influence of nicotine addiction on telomerase activity in malignant non-small cell lung tumors. *Przegl Lek* 62 (2005) 1043-6
59. Todaka Y., Wang Y., Tashiro K., Nakashima N., Nishimoto T., Sekiguchi T. Association of the GTP-Binding Protein Gtr1p With Rpc19p, a Shared Subunit of RNA Polymerase I and III in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 170 (2005) 1515–1524
60. Tong A.H.Y., Evangelista M., Parsons A. B., Xu H., Bader G.D., Page N., Robinson M., Raghibizadeh S., Hogue C.W.V., Bussey H., Andrews B., Tyers M., Boone C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294 (2001) 2364–2368
61. Tong A.H.Y., Lesage G., Bader G.D., Ding H., Xu H., Xin X., Young J., Berriz G.F., Brost R.L., Chang M., Chen Y.Q., Cheng X., Chua G., Friesen H., S. Goldberg D.S., Haynes J., Humphries C., He G., Hussein S., Ke L., Krogan N., Li Z., Levinson J.N., Lu H., Menard P., Munyana C., Parsons A.B., Ryan O., Tonikian R., Roberts T., Sdicu A.M., Shapiro J., Sheikh B., Suter B., Wong S.L., Zhang L.V., Zhu H., Burd C.G., Munro S., Sander C., Rine J., Greenblatt J., Peter M., Bretscher A., Bell G., Roth F.P., Brown G.W., Andrews B., Bussey H., Boone C. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303 (2004) 808-813
62. Tucker C.L., Fields S. Quantitative genome-wide analysis of yeast deletion strain sensitivities to oxidative and chemical stress. *Comp Funct Genom* 5 (2004) 216–224
63. Tutka P., Mosiewicz J., Wielosz M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Farmacological Report* 57 (2005) 143-153
64. Umabayashi K., Nakano A. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* 161, 6 (2003) 1117–1131
65. van Roermund C.W.T., de Jong M., Ijlst L., van Marle J., Dansen T.B., Wanders R.J.A., Waterham H.R. The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *Journal of Cell Science* 117 (2004) 4231-4237
66. van Roermund C.W.T., Drissen R., van Den Berg M., Ijlst L., Hetteema E.H., Tabak H.F., Waterham H.R., Wanders R. Identification of a Peroxisomal ATP Carrier required for Medium-Chain Fatty Acid β -Oxidation and Normal Peroxisome Proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 13 (2001) 4321–4329
67. van Roermund C.W.T., Waterham H.R., Ijlst L., Wanders R.J.A. Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Review. *Cell. Molecular Life Science* 60 (2003) 1838–1851
68. Wagner A., Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nature Genet.* 24 (2000) 355-361
69. Wang Q., Rymond B.C. Rds3p Is Required for Stable U2 snRNP Recruitment to the Splicing Apparatus. *Molecular and Cellular Biology* 23, 20 (2003) 7339–7349
70. Wendland B., Steece K.E., Emr S.D. Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis. *The EMBO Journal* 18 (1999) 4383–4393
71. Winzler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S.H., Gentalen E., Giaever G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Stroms R.K., Veronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M., Davis R.W. Functional characterization of the *S.cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285 (1999) 901–906
72. Witzig T.E., Timm M., Stenson M., Svingen P.A., Kaufmann S.H. Induction of Apoptosis in Malignant B Cells by Phenylbutyrate or Phenylacetate in Combination with Chemotherapeutic Agents. *Clinical Cancer Research* 681 (2000) 681–692
73. Wright J.M., Zeitlin P.L., Cebotaru L., Guggino S.E., Guggino W.B. Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate demonstrates a major influence on heat-shock proteins treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line. *Physiological Genomics* 16 (2004) 204-211

5.2 KNJIGE

- Hodgson E., Levi P.E. 1997. A textbook of modern toxicology. 2. izdaja. Stamford, Connecticut. Appleton & Lange : 496 str.
- Lam P., Richardson B., Wu R. 1999. Introduction to ecotoxicology. 1. izdaja. Cornwall, Great Britain. Blackwell Science : 170 str.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. 4. izdaja. New York, USA. Garland Science : 1463 str.
- Cooper G.M., Hausman R.E. 2007. The Cell : A Molecular Approach. 4. izdaja. Washington, USA. ASM Press : 765 str.
- Stryer L. 2000. Biochemistry. 4. izdaja New York, USA. W.H. Freeman and Company : 1064 str.
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. 2. izdaja. Ljubljana. Študentska založba : 617 str.

5.3 ELEKTRONSKI VIRI

- *Saccharomyces* Genome Database (SGD)
URL: <http://www.yeastgenome.org>
- Munich Information Centre for Proteine Seqences (MIPS)
URL: <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast>
- *Saccharomyces* Genome Deletion Project (jan.2003)
URL: http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/ (dec.2006)
- Turk T. Toksinologija z osnovami toksikologije (26.nov.2004)
URL: <http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/Toksinologija%20s%20toksikologijo.htm>
(28.dec.2006)
- Drobne D. Ekotoksikologija- Prosojnice s predavanj, Ljubljana (2002)
URL: http://www.fgg.uni-lj.si/~sdrobne/ddrobne/ng_okolje.html (28.dec.2006)
- Wikipedia. The Thalidomide Tragedy
URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Thalidomide> (28.dec.2006)
- Sherman F. An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (1998)
URL: http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/Sherman_f/yeast/Index.html (20.dec.2006)
- Nelson D. Lecture 1 on Yeast Genetics - Yeast as a Model Eukaryote (2001)
URL: <http://drnelson.utmem.edu/yeastlect1.html> (2.jan.2007)
- *Saccharomyces cerevisiae* Genome Snapshot/Overview. *Saccharomyces* Genome Database
URL: <http://www.yeastgenome.org/cache/genomeSnapshot.html> (28.dec.2006)
- Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR) za zdravilo Ammonaps (29.jun.2006)
URL: <http://www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/ammonaps/ammonaps.htm>
(10.jan.2007)
- de Landoni J.H. Nicotine. Section of Toxicology, Hospital de Clinicas San Martin, Argentina (1991)
URL: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/nicotine.htm> (15.jan.2007)

- Nicotine: pharmacokinetics, metabolism and pharmacodynamics. Center for Disease Control and Prevention (2005)
URL: http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr_1988/1988SGR-Chapter%202.pdf (15.jan.2007)
- Europa, Environment. REACH (17.jan.2007)
URL: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm (29.jan.2007)
- Chang P. Hopes. Nicotinamide, Disease Mechanism III: Abnormalities in Energy Metabolism (2004)
URL: <http://www.stanford.edu/group/hopes/treatmts/ebuffer/j3.html> (1.feb.2007)
- Wikipedia. Adiponectin (2006)
URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Adiponectin> (18.feb.2007)
- Wikipedia. Sodium phenylbutyrate
URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_phenylbutyrate (12.jan.2007)

PRILOGA A

KEMIJSKO-GENETSKI PROFIL za 10 mM PB in biološki procesi, v katerih so udeleženi identificirani geni (vir podatkov: *Saccharomyces* Genome Database, GO Slim Mapper, YeastGO-Slim:Process z dne 25.01.2007)

Δgen	ΔORF	biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen	rast
SPO11	YHL022C	celični cikel, mejoza, metabolizem DNK	(---)
CLB2	YPR119W	celični cikel	(---)
SPO13	YHR014W	celični cikel, mejoza	(---)
ZIP2	YGL249W	celični cikel, mejoza	(---)
BMH2	YDR099W	celični cikel, odziv na stres, celično signaliziranje, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije, metabolizem ogljikovih hidratov, morfogeneza, psevdohifna rast, sporulacija	(-)
BAG7	YOR134W	celično signaliziranje	(---)
CWH43	YCR017C	celično signaliziranje, organizacija in sinteza celične stene	(---)
YDR115W	YDR115W	generiranje prekurzorskih metabolitov in energije, organizacija in biogeneza organelov, celična respiracija	(--)
PAI3	YMR174C	katabolizem proteinov	(---); (--)
SCW10	YMR305C	konjugacija	(---)
GPA1	YHR005C	konjugacija, celično signaliziranje	(--)
CTF3	YLR381W	ločevanje kromosomov	(---)
SUV3	YPL029W	matabolizem RNK	(-)
SWI5	YDR146C	matabolizem RNK, celični cikel, transkripcija	(-)
SIN4	YNL236W	matabolizem RNK, transkripcija	(-)
OCA5	YHL029C	metabolizem	(---)
YEL047C	YEL047C	metabolizem	(--)
ARO4	YBR249C	metabolizem AK	(--)
APE2	YKL157W	metabolizem AK	(--)
GCV2	YMR189W	metabolizem AK	(--)
CYS3	YAL012W	metabolizem AK	2X(---);(--)
GLY1	YEL046C	metabolizem AK	(+)
HIS7	YBR248C	metabolizem AK	(+);(-)
ARO2	YGL148W	metabolizem AK, metabolizem aromatskih spojin	(----)
ARO7	YPR060C	metabolizem AK, metabolizem aromatskih spojin	(----)
FMT1	YBL013W	metabolizem AK, metabolizem RNK, biosinteza proteinov	(--)
GCV3	YAL044C	metabolizem AK, organizacija in biogeneza organelov	(-)
TPS2	YDR074W	metabolizem energijskih rezerv, odziv na stres, metabolizem ogljikovih hidratov, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije	(----)
BMH1	YER177W	metabolizem energijskih rezerv, regulacija celičnega cikla, psevdohifna rast, odziv na stres, metabolizem ogljikovih hidratov, morfogeneza, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije, celični cikel, celično signaliziranje, sporulacija	(----)
ADE3	YGR204W	metabolizem folne kisline, biogeneza nukleotidov	(+)
CEM1	YER061C	metabolizem lipidov	(---)
LRO1	YNR008W	metabolizem lipidov	(---)
ERG6	YML008C	metabolizem lipidov	(--)
HTD2	YHR067W	metabolizem lipidov	(+)
IZH3	YLR023C	metabolizem lipidov, celična homeostaza	(---)
ETR1	YBR026C	metabolizem lipidov, generiranje prekurzijskih metabolitov in energije, celična respiracija	(+)
YEH2	YLR020C	metabolizem lipidov, organizacija in sinteza celične stene, biosinteza proteinov	(--)
GID7	YCL039W	metabolizem ogljikovih hidratov, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije	(--)
PYC2	YBR218C	metabolizem ogljikovih hidratov, metabolizem vitaminov, generiranje prekurzorskih metabolitov in energije	(---)
EXG1	YLR300W	metabolizem ogljikovih hidratov, organizacija in sinteza celične stene	(--)
HAP3	YBL021C	metabolizem ogljikovih hidratov, transkripcija	(--)
PDB1	YBR221C	metabolizem piruvata	(+)

"se nadaljuje,"

”nadaljevanje,,

<i>Δgen</i>	<i>ΔORF</i>	<i>biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen</i>	<i>rast</i>
<i>MRS1</i>	YIR021W	metabolizem RNK	(---)
<i>RAS2</i>	YNL098C	metabolizem RNK, celično signaliziranje, transkripcija, morfogeneza, sporulacija, psevdohifna rast	(---)
<i>MGA2</i>	YIR033W	metabolizem RNK, odziv na stres, metabolizem lipidov, transkripcija	(---); (---)
<i>ISW1</i>	YBR245C	metabolizem RNK, organizacija in biogeneza organelov, transkripcija, metabolizem DNK	(----)
<i>IKI3</i>	YLR384C	metabolizem RNK, transkripcija	(---)
<i>ZAP1</i>	YJL056C	metabolizem RNK, transkripcija, celična homeostaza	(+)
<i>EMI1</i>	YDR512C	metabolizem RNK, transkripcija, sporulacija	(+)
<i>CYC3</i>	YAL039C	modifikacija proteinov	(---)
<i>PET117</i>	YER058W	modifikacija proteinov (citokroma)	(+)
<i>SLT2</i>	YHR030C	modifikacija proteinov, celično signaliziranje, organizacija in sinteza celične stene	(---)
<i>KTR4</i>	YBR199W	modifikacija proteinov, biosinteza proteinov	(---)
<i>SPR3</i>	YGR059W	morfogeneza, organizacija in sinteza celične stene, konjugacija, sporulacija	(---)
<i>WAR1</i>	YML076C	odziv na stres - na kisline	(----)
<i>GRX3</i>	YDR098C	odziv na stres	(-)
<i>SSK1</i>	YLR006C	odziv na stres, celično signaliziranje	(----)
<i>UMP1</i>	YBR173C	odziv na stres, katabolizem proteinov	(---); (---)
<i>DOA1</i>	YKL213C	odziv na stres, katabolizem proteinov, metabolizem DNK, modifikacija proteinov	(--)
<i>SAN1</i>	YDR143C	odziv na stres, katabolizem proteinov, organizacija in biogeneza organelov, metabolizem DNK	(--)
<i>RCK2</i>	YLR248W	odziv na stres, modifikacija proteinov, celično signaliziranje, celični cikel, mejoza	(---)
<i>HIT1</i>	YJR055W	organizacija in biogeneza organelov	(-)
<i>PEX28</i>	YHR150W	organizacija in biogeneza organelov	(---)
<i>BEM4</i>	YPL161C	organizacija in biogeneza organelov, celično signaliziranje, morfogeneza, organizacija citoskeleta	(---)
<i>CIK1</i>	YMR198W	organizacija in biogeneza organelov, celični cikel, mejoza, organizacija citoskeleta, konjugacija, organizacija jedra	(---)
<i>LRP1</i>	YHR081W	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, odziv na stres, metabolizem DNK, sestavljene ribosomov	(---)
<i>ARD1</i>	YHR013C	organizacija in biogeneza organelov, modifikacija proteinov	(-)
<i>PPT1</i>	YGR123C	organizacija in biogeneza organelov, modifikacija proteinov, sestavljene ribosomov	(---)
<i>RAD59</i>	YDL059C	organizacija in biogeneza organelov, odziv na stres, metabolizem DNK	(+)
<i>MON2</i>	YNL297C	organizacija in biogeneze organelov, transport, vezikularni transport	(+)
<i>SLM6</i>	YBR266C	organizacija in biogeneze organelov, transport, vezikularni transport	(+)
<i>MDM12</i>	YOL009C	organizacija in biogeneze organelov	(+)
<i>HMO1</i>	YDR174W	organizacija in biogeneze organelov	(+)
<i>LOC1</i>	YFR001W	organizacija in biogeneze organelov, biogeneza ribosomov	(+)
<i>KEM1</i>	YGL173C	organizacija in biogeneze organelov, metabolizem RNK, biogeneza ribosomov, konjugacija, celični cikel	(+)
<i>RPO41</i>	YFL036W	organizacija in biogeneze organelov, metabolizem RNK, transkripcija	(+)
<i>KCS1</i>	YDR017C	organizacija in biogeneze organelov, odziv na stres	(+)
<i>SNF5</i>	YBR289W	organizacija in biogeneze organelov, odziv na stres, metabolizem DNK	(+)
<i>CYC2</i>	YOR037W	organizacija in biogeneze organelov, organizacija in biogeneze membran, modifikacija proteinov	(+)
<i>RPL13B</i>	YMR142C	organizacija in biogeneze organelov, translacija	(+)
<i>ECM8</i>	YBR076W	organizacija in sinteza celične stene	(----)
<i>SPT4</i>	YGR063C	organizacija organelov in biogeneza, metabolizem RNK, transkripcija, metabolizem DNK	2X(----)
<i>ASH1</i>	YKL185W	psevdohifna rast, metabolizem RNK, transkripcija, morfogeneza	(----)
<i>FPR3</i>	YML074C	regulacija celičnega cikla, mejoza	(----)
<i>SPO71</i>	YDR104C	sporulacija	(--)
<i>STB5</i>	YHR178W	transkripcija, odziv na stres	(---)
<i>GAT2</i>	YMR136W	transkripcija	(---); (---)
<i>HAP2</i>	YGL237C	transkripcija, metabolizem ogljikovih hidratov	(+)
<i>YAP3</i>	YHL009C	transkripcija, metabolizem RNK	(--)

”se nadaljuje,,

”nadaljevanje,,

Δgen	ΔORF	biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen	rast
RPL22A	YLR061W	translacija	(+)
RPP1B	YDL130W	translacija	(+)
RPL2B	YIL018W	translacija	(+)
ZUO1	YGR285C	translacija	2X(+)
RPS9B	YBR189W	translacija	(+)
RPL43A	YPR043W	translacija	(+)
SSZ1	YHR064C	translacija	(+)
FUI1	YBL042C	transport	(----)
GYP6	YJL044C	transport	(----)
MIP6	YHR015W	transport	(---)
MEP1	YGR121C	transport	(---)
PTK1	YKL198C	transport	(---)
VPS30	YPL120W	transport	(---)
YFR045W	YFR045W	transport	(---)
NPR2	YEL062W	transport	(--)
APG12	YBR217W	transport	(-)
PDR12	YPL058C	transport	(-)
CTR1	YPR124W	transport	(-)
AGP1	YCL025C	transport	(-)
ERG3	YLR056W	transport, metabolizem lipidov, vezikularni transport	(----)
VMA4	YOR332W	transport, celična homeostaza	(--)
RSB1	YOR049C	transport, metabolizem lipidov, organizacija membrane	(----)
FEN1	YCR034W	transport, metabolizem lipidov, vezikularni transport	(--)
VMA10	YHR039C-B	transport, metabolizem ogljikovih hidratov, generiranje prekursorskih metabolitov in energije, celična homeostaza	(--)
AIR1	YIL079C	transport, metabolizem RNK	(---)
FZF1	YGL254W	transport, metabolizem RNK, transkripcija	(---)
OCT1	YKL134C	transport, modifikacija proteinov, celična homeostaza	(+)
ATX1	YNL259C	transport, odziv na stres, celična homeostaza	(---)
VPS75	YNL246W	transport, organizacija in biogeneza organelov	(---)
TAT2	YOL020W	transport, organizacija in biogeneza organelov	(---)
NUP133	YKR082W	transport, organizacija in biogeneza organelov, metabolizem DNK, organizacija jedra	(-)
ANT1	YPR128C	transport, organizacija in biogeneza organelov, metabolizem lipidov	(----)
NUM1	YDR150W	transport, organizacija in biogeneza organelov, organizacija citoskeleta,	(-)
DOA4	YDR069C	transport, organizacija in biogeneza organelov, vezikularni transport, modifikacija proteinov, metabolizem DNK	(---)
ARK1	YNL020C	transport, organizacija in biogeneza organelov, vezikularni transport, modifikacija proteinov, organizacija citoskeleta, citokineza	(---)
SLG1	YOR008C	transport, organizacija in biogeneza organelov, vezikularni transport, odziv na stres, prenos signala, morfogeneza, organizacija citoskeleta, organizacija in sinteza celične stene	(---)
BZZ1	YHR114W	transport, organizacija in biogeneza organelov, vezikularni transport, odziv na stres, organizacija citoskeleta	(---)
ENT2	YLR206W	transport, organizacija in biogeneza organelov, vezikularni transport, organizacija citoskeleta	(----)
GTR1	YML121W	transport, organizacija organelov in biogeneza, metabolizem RNK, transkripcija	2X(----)
SRO77	YBL106C	transport, vezikularni transport	(----)
KIN1	YDR122W	transport, vezikularni transport	(---)
KIN2	YLR096W	transport, vezikularni transport	(---)
ARL3	YPL051W	transport, vezikularni transport	(---)
YAP1801	YHR161C	transport, vezikularni transport	(--)
VPS4	YPR173C	transport, vezikularni transport, metabolizem lipidov	(---)
DNF2	YDR093W	transport, vezikularni transport, metabolizem lipidov, morfogeneza, organizacija membrane	(---)
TMS1	YDR105C	nepoznan	(----)
	YAL043C-a	nepoznan	(----)

”se nadaljuje,,

”nadaljevanje,”

<i>Δgen</i>	<i>ΔORF</i>	<i>biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen</i>	<i>rast</i>
<i>YAL037W</i>	<i>YAL037W</i>	nepoznan	(----)
<i>PSP2</i>	<i>YML017W</i>	nepoznan	(----)
<i>SNA2</i>	<i>YDR525W-A</i>	nepoznan	(----)
<i>YDL010W</i>	<i>YDL010W</i>	nepoznan	(----)
<i>APD1</i>	<i>YBR151W</i>	nepoznan	(----)
<i>YDR535C</i>	<i>YDR535C</i>	nepoznan	(----)
<i>YPR089W</i>	<i>YPR089W</i>	nepoznan	(----)
<i>YBL059W</i>	<i>YBL059W</i>	nepoznan	(---)
<i>YBL060W</i>	<i>YBL060W</i>	nepoznan	(---)
<i>DOS2</i>	<i>YDR068W</i>	nepoznan	(---)
<i>YAL061W</i>	<i>YAL061W</i>	nepoznan	(---)
<i>MOH1</i>	<i>YBL049W</i>	nepoznan	(---)
<i>YDR336W</i>	<i>YDR336W</i>	nepoznan	(---)
<i>YGR051C</i>	<i>YGR051C</i>	nepoznan	(---)
<i>YGR039W</i>	<i>YGR039W</i>	nepoznan	(---)
<i>YGL262W</i>	<i>YGL262W</i>	nepoznan	(---)
<i>YHR159W</i>	<i>YHR159W</i>	nepoznan	(---)
<i>ALT1</i>	<i>YLR089C</i>	nepoznan	(---)
<i>YNL205C</i>	<i>YNL205C</i>	nepoznan	(---)
<i>YPL073C</i>	<i>YPL073C</i>	nepoznan	(---)
<i>YPR157W</i>	<i>YPR157W</i>	nepoznan	(---)
<i>YPR084W</i>	<i>YPR084W</i>	nepoznan	(---)
<i>IRC4</i>	<i>YDR540C</i>	nepoznan	(---)
<i>GAS2</i>	<i>YLR343W</i>	nepoznan	(---); (---)
<i>YAR023C</i>	<i>YAR023C</i>	nepoznan	(--)
<i>FYV8</i>	<i>YGR196C</i>	nepoznan	(--)
<i>YKR032W</i>	<i>YKR032W</i>	nepoznan	(--)
<i>IRC25</i>	<i>YLR021W</i>	nepoznan	(--)
<i>SPG5</i>	<i>YMR191W</i>	nepoznan	(--)
<i>IRC15</i>	<i>YPL017C</i>	nepoznan	(--)
<i>GAS2</i>	<i>YLR343W</i>	nepoznan	(--)
<i>YHR210C</i>	<i>YHR210C</i>	nepoznan	(-)
<i>YLR001C</i>	<i>YLR001C</i>	nepoznan	(-)
<i>YML089C</i>	<i>YML089C</i>	nepoznan	(-)
<i>YKL069W</i>	<i>YKL069W</i>	nepoznan	(-)
<i>YKL118W</i>	<i>YKL118W</i>	nepoznan	(-)
<i>YCL005W</i>	<i>YCL005W</i>	nepoznan	(-)
<i>YBR246W</i>	<i>YBR246W</i>	nepoznan	(-)
<i>YLR073C</i>	<i>YLR073C</i>	nepoznan	(+)
<i>IRC11</i>	<i>YOR013W</i>	nepoznan	(+)
<i>KRE24</i>	<i>YPL102C</i>	nepoznan	(+)
<i>SOY1</i>	<i>YBR194W</i>	nepoznan	(+)
<i>YDL183C</i>	<i>YDL183C</i>	nepoznan	(+)
<i>SGM1</i>	<i>YJR134C</i>	nepoznan	(+)

Glede na različno občutljivost na PB smo razvrstili rast sevov v pet kategorij: (-), (--), (---), (----) in (+); opisi posameznih kategorij občutljivosti so podani v točki 4.3. Nekatere delecijejske mutante, ki se nahajajo v YKO zbirki na več mestih, so bile večkrat identificirane kot občutljive na PB (na primer sev *gtr1Δ*, *mga2Δ*, *spt4Δ*...).

Sevi, ki smo jih testirali v testu z redčinami, so v tabeli osenčeni.

PRILOGA B

KEMIJSKO-GENETSKI PROFIL za 10 mM PA in biološki procesi, v katerih so udeleženi identificirani geni (vir podatkov: *Saccharomyces* Genome Database, GO Slim Mapper, YeastGO-Slim:Process z dne 02.02.2007)

Δgen	ΔORF	biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen	rast
MRP21	YBL090W	translacija	(--)
TRM82	YDR165W	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, biogeneza ribosomov	(--)
BUB1	YGR188C	modifikacija proteinov, celični cikel	(--)
YHR009C	YHR009C	nepoznan	(--)
ECM4	YKR076W	organizacija in biogeneza celične stene	(--)
MAC1	YMR021C	metabolizem RNK, katabolizem proteinov, celična homeostaza, transkripcija	(--)
MKS1	YNL076W	celično signaliziranje	(--)
CYC2	YOR037W	organizacija in biogeneza organelov, modifikacija proteinov, organizacija in biogeneza membran	(--)
PDR12	YPL058C	transport	(--)
RPL19A	YBR084C-A	translacija	(+)
APG12	YBR217W	modifikacija proteinov	(+)
BUD3	YCL014W	celična delitev	(+)
IRC2	YDR112W	nepoznan	(+)
DON1	YDR273W	celični cikel, organizacija in biogeneza celične stene, sporulacija, mejoza	(+)
YDR274C	YDR274C	nepoznan	(+)
YDR426C	YDR426C	nepoznan	(+)
CAJ1	YER048C	nepoznan	(+)
PDA1	YER178W	metabolizem piruvata	(+)
ERP6	YGL002W	transport	(+)
RPN14	YGL004C	katabolizem proteinov	(+)
ZUO1	YGR285C	translacija	(+)
YHR210C	YHR210C	nepoznan	(+)
SPG5	YMR191W	nepoznan	(+)
ERG2	YMR202W	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem lipidov	(+)
YNL092W	YNL092W	nepoznan	(+)
HTZ1	YOL012C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK in DNK, transkripcija	(+)
MDM20	YOL076W	organizacija in biogeneza organelov, modifikacija proteinov, organizacija in biogeneza citoskeleta	(+)
VMA4	YOR332W	organizacija in biogeneza organelov, celična homeostaza	(+)
BEM3	YPL115C	celično signaliziranje, psevdohifna rast	(+)
ATP20	YPR020W	transport, generiranje prekurzijskih metabolitov in energije	(+)
RPL43A	YPR043W	translacija	(+)
VPS66	YPR139C	transport	(+)

Glede na različno občutljivost na PA smo razvrstili rast sevov v pet kategorij: (-), (--), (---), (----) in (+), vendar ni bil noben sev uvrščen v kategorijo (-), (--), in (----) ; opisi posameznih kategorij občutljivosti so podani v točki 4.3. Z rdečo barvo so označeni sevi, ki smo jih identificirali tudi v presejalnem testu z 10 mM PB.

PRILOGA C

KEMIJSKO-GENETSKI PROFIL za 10 mM nikotin in biološki procesi, v katerih so udeleženi identificirani geni (vir podatkov: *Saccharomyces* Genome Database, GO Slim Mapper, YeastGO-Slim:Process z dne 02.02.2007)

Δgen	ΔORF	biološki proces v celici , v katerem je gen udeležen	rast
ECM18	YDR125C	organizacija in biogeneza celične stene	(--)
FUM1	YPL262W	generiranje prekurzirskih metabolitov in energije, celično dihanje, metabolizem ogljikovih hidratov	(--)
COQ10	YOL008W	generiranje prekurzirskih metabolitov in energije, celično dihanje	(+)
GSY1	YFR015C	generiranje prekurzirskih metabolitov in energije, metabolizem ogljikovih hidratov	(--)
CYB2	YML054C	generiranje prekurzirskih metabolitov in energije, prenos elektronov	(--)
FYV5	YCL058C	homeostaza	(+)
NAS2	YIL007C	katabolizem proteinov	(---)
LPD1	YFL018C	metabolizem AK	(--)
SDL1	YIL168W	metabolizem AK	(--)
CSM2	YIL132C	metabolizem DNK, celični cikel, odziv na stres, mejoza	(+)
SLX4	YLR135W	metabolizem DNK, odziv na stres	(+)
PPN1	YDR452W	metabolizem fosfata	(+)
ERG3	YLR056W	metabolizem fosfata, transport, vezikularni transport, organizacija in biogeneza membran, metabolizem lipidov	(+)
BTS1	YPL069C	metabolizem lipidov	(--)
MSL1	YIR009W	metabolizem RNK	(---)
TRM3	YDL112W	metabolizem RNK	(--)
DCS1	YLR270W	metabolizem RNK	(+)
AZF1	YOR113W	metabolizem RNK, transkripcija	(+)
ELP3	YPL086C	metabolizem RNK, transkripcija	(+)
EMI5	YOL071W	metabolizem RNK, transkripcija, sporulacija	(--)
NPY1	YGL067W	metabolizem vitaminov	(-)
YML082W	YML082W	metabolizem žvepla	(---)
UBP6	YFR010W	modifikacija proteinov	(+)
GNT1	YOR320C	modifikacija proteinov	(--)
DIA2	YOR080W	modifikacija proteinov, metabolizem DNK, morfogeneza	(+)
KEL1	YHR158C	morfogeneza, celični cikel, konjugacija, organizacija in biogeneza membran	(+)
BEM3	YPL115C	morfogeneza, celično signaliziranje, psevdohifna rast	(+)
BEM1	YBR200W	morfogeneza, konjugacija	(--)
FUS1	YCL027W	morfogeneza, konjugacija	(--)
WAR1	YML076C	odziv na kisline, transkripcija	(--)
FYV4	YHR059W	organizacija in biogeneza organelov	(+)
MDM12	YOL009C	organizacija in biogeneza organelov	(+)
YPL041C	YPL041C	organizacija in biogeneza organelov	(--)
REC8	YPR007C	organizacija in biogeneza organelov, celični cikel, mejoza	(+)
YDR115W	YDR115W	organizacija in biogeneza organelov, generiranje prekurzirskih metabolitov in energije, celično dihanje	(--)
JEM1	YJL073W	organizacija in biogeneza organelov, konjugacija, organizacija in biogeneza jedra, katabolizem proteinov	(+)
RRD1	YIL153W	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem DNK, celični cikel, odziv na stres, organizacija in biogeneza citoskeleta	(--)
SHE4	YOR035C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem DNK, organizacija in biogeneza citoskeleta	(+)
CBC2	YPL178W	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK	(-)
MRM2	YGL136C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK	(-)
HTZ1	YOL012C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, metabolizem DNK, transkripcija	(+)
SIR3	YLR442C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, metabolizem DNK, transkripcija, odziv na stres	(--)

”se nadaljuje,,

”nadaljevanje,,

Δgen	ΔORF	biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen	rast
<i>CDC73</i>	YLR418C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, modifikacija proteinov, metabolizem DNK, transkripcija	(+)
<i>SSN3</i>	YPL042C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, modifikacija proteinov, transkripcija, celični cikel, meja	(+)
<i>PUF6</i>	YDR496C	organizacija in biogeneza organelov, metabolizem RNK, transkripcija, biogeneza ribosomov	(--)
<i>RMT2</i>	YDR465C	organizacija in biogeneza organelov, modifikacija proteinov, biogeneza ribosomov	(--)
<i>MDM20</i>	YOL076W	organizacija in biogeneza organelov, modifikacija proteinov, organizacija in biogeneza citoskeleta	(--)
<i>PRS3</i>	YHL011C	organizacija in biogeneza organelov, morfogeneza, metabolizem AK, biogeneza ribosomov	(+)
<i>RPL34B</i>	YIL052C	organizacija in biogeneza organelov, translacija	(-)
<i>RPS16B</i>	YDL083C	organizacija in biogeneza organelov, translacija	(+)
<i>NUP84</i>	YDL116W	organizacija in biogeneza organelov, transport, metabolizem DNK, odziv na stres, organizacija in biogeneza membran, organizacija in biogeneza jedra	(--)
<i>TOM1</i>	YDR457W	organizacija in biogeneza organelov, transport, modifikacija proteinov, morfogeneza, celični cikel, organizacija in biogeneza jedra	(--)
<i>NUM1</i>	YDR150W	organizacija in biogeneza organelov, transport, organizacija in biogeneza citoskeleta	(-)
<i>NHX1</i>	YDR456W	organizacija in biogeneza organelov, transport, vezikularni transport, homeostaza	(--)
<i>CDA1</i>	YLR307W	sporulacija, organizacija in biogeneza celične stene	(--)
<i>SPO71</i>	YDR104C	sporulacija, organizacija in biogeneza celične stene	(-)
<i>GCN20</i>	YFR009W	translacija	(----)
<i>RPL16A</i>	YIL133C	translacija	(-)
<i>RPL27B</i>	YDR471W	translacija	(--)
<i>RPL2A</i>	YFR031C-A	translacija	(--)
<i>RPS10B</i>	YMR230W	translacija	(+)
<i>RPS24B</i>	YIL069C	translacija	(--)
<i>MET13</i>	YGL125W	translacija, metabolizem AK	(--)
<i>AGP1</i>	YCL025C	transport	(--)
<i>ATG22</i>	YCL038C	transport	(+)
<i>VPS69</i>	YPR087W	transport	(--)
<i>VPS73</i>	YGL104C	transport	(--)
<i>NPC2</i>	YDL046W	transport	(--)
<i>IST3</i>	YIR005W	transport, metabolizem RNK	(----)
<i>ATG3</i>	YNR007C	transport, modifikacija proteinov	(--)
<i>OCT1</i>	YKL134C	transport, modifikacija proteinov, homeostaza	(--)
<i>ERV29</i>	YGR284C	transport, vezikularni transport	(--)
<i>PEP12</i>	YOR036W	transport, vezikularni transport	(+)
<i>YCL042W</i>	YCL042W	nepoznan	(-)
<i>YAR023C</i>	YAR023C	nepoznan	(--)
<i>YDR215C</i>	YDR215C	nepoznan	(--)
<i>YIL087C</i>	YIL087C	nepoznan	(-)
<i>SET6</i>	YPL165C	nepoznan	(--)
<i>TMA17</i>	YDL110C	nepoznan	(--)
<i>PSP1</i>	YDR505C	nepoznan	(--)
<i>YML058C-A</i>	YML058C-A	nepoznan	(--)
<i>OPI6</i>	YDL096C	nepoznan	(--)
<i>YGL118C</i>	YGL118C	nepoznan	(----)
<i>YDR491C</i>	YDR491C	nepoznan	(--)
<i>YML079W</i>	YML079W	nepoznan	(--)
<i>HXT12</i>	YIL170W	nepoznan	(--)
<i>JIP4</i>	YDR475C	nepoznan	(--)
<i>TMA108</i>	YIL137C	nepoznan	(--)
<i>YDL057W</i>	YDL057W	nepoznan	(--)
<i>YOR314W</i>	YOR314W	nepoznan	(--)
<i>YLR031W</i>	YLR031W	nepoznan	(--)

”se nadaljuje,,

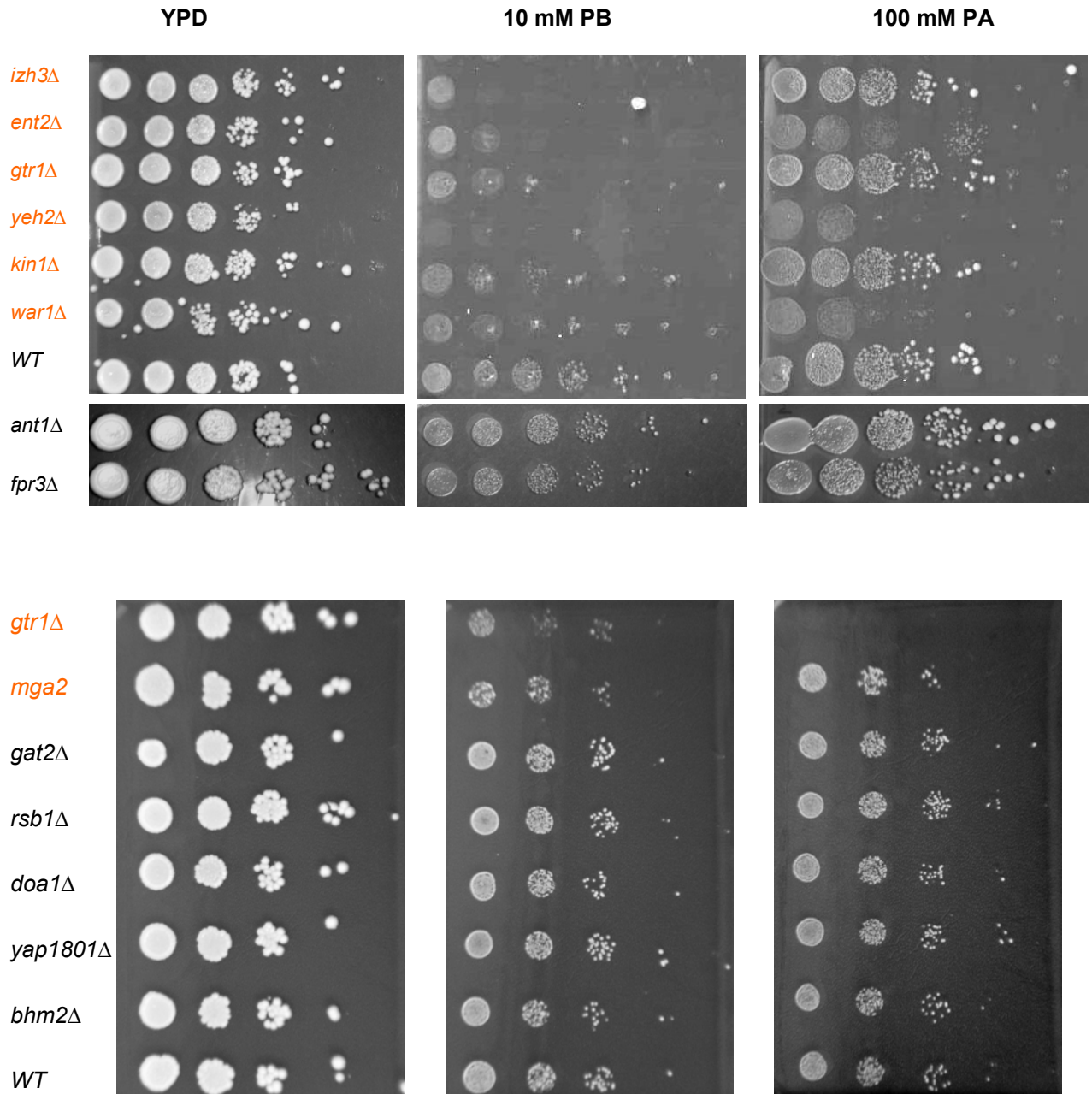
”nadaljevanje,”

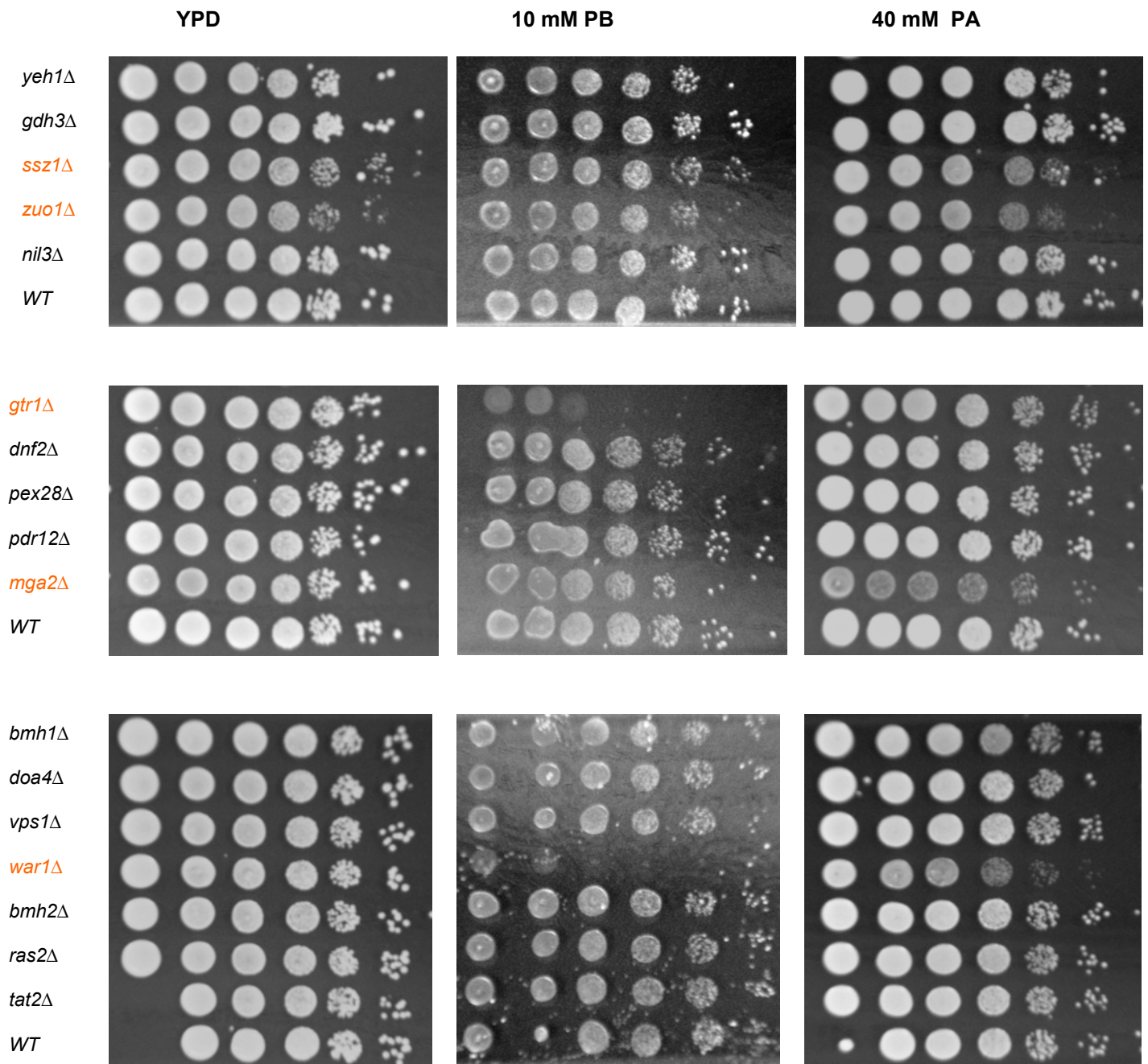
Δgen	ΔORF	biološki proces v celici, v katerem je gen udeležen	rast
YGR290W	YGR290W	nepoznan	(---)
STP4	YDL048C	nepoznan	(---)
YDL050C	YDL050C	nepoznan	(---)
YBL012C	YBL012C	nepoznan	(+)
YDR249C	YDR249C	nepoznan	(+)
YLR177W	YLR177W	nepoznan	(+)
YNL171C	YNL171C	nepoznan	(+)
MRN1	YPL184C	nepoznan	(+)

Glede na različno občutljivost na nikotin smo razvrstili rast sevov v pet kategorij : (-), (--), (---), (----) in (+); opisi posameznih kategorij občutljivosti so podani v točki 4.3. Z rdečo barvo so označeni geni, katerih delecija vpliva na dolžino telomer (Gatbonton in sod., 2006).

PRILOGA D

REZULTATI TESTA Z REDČINAMI NA AGARNIH PLOŠČAH: s testom z redčinami smo dodatno testirali rast izbranih sevov iz kemijsko-genomskega profila za PB (označeni v prilogi A) na gojiščih z 10 mM PB in 100 oziroma 40 mM PA.





Vsi sevi, ki imajo spremenjeno rast na gojiščih s PB in/ali PA, so označeni z rdečo barvo.

OKRAJŠAVE, OZNAKE IN TERMINOLOGIJA

Okrajšave

ADP	adenozin-5-difosfat
AK	amino kislina
ATP	adenozin-5-trifosfat, univerzalni prenašalec energije v biokemijskih procesih
bp	bazni par
dH ₂ O	deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GDP	gvanozin-5-difosfat
GTP	gvanozin-5-trifosfat
K _a	disociacijska konstanta kisline
kb	kilo (10 ³) baz
M	množinska koncentracija, enota mol/L
MAT _a	paritveni tip a
MAT _α	paritveni tip α
mol	množina snovi (6,02X10 ²³ delcev)
mRNA	informacijska RNA
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid, reducirana oblika
ORF	odprt bralni okvir (ang. »open reading frame«), zaporedje nukleotidov, ki kodira zapis za protein
PA	fenilacetat
PB	fenilbutirat
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije oksonijevih (H ₃ O ⁺) ionov
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska RNA
tRNA	prenašalna RNA

Mednarodne oznake za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*

Nomenklatura genov kvasovke je splošno sprejeta. V **tabeli I.** so prikazane mednarodne oznake in okrajšave s področja genetike na primeru gena *ARG2*. Vsak gen označujemo s tremi črkami v ležečem slogu, ki so običajno izpeljane iz funkcijske vloge tega gena v celici, in eno ali dvomestno številko.

Tabela I. , Mednarodne oznake in okrajšave, prikazane na primeru *ARG2*

simbol	Definicija
<i>ARG2</i>	dominanten- aktiven alel
<i>arg2</i>	recesiven- neaktiven alel, sev je avksotrofen za arginin

Arg2p	protein, ki ga kodira gen <i>ARG2</i>
<i>arg2-Δ1</i>	celotna ali delna delecija gena <i>ARG2</i>
<i>arg2::LEU2</i>	insercija funkcionalnega gena <i>LEU2</i> na mesto <i>ARG2</i> in <i>arg2</i> je nefunkcionalni gen

ORF oznaka je sistematično ime za gen in opisuje mesto gena v genomu.

Sedemmestno ORF oznako sestavljajo:

- črka Y- za kvasovko (angl. »yeast«),
- druga črka označuje kromosom, kjer je lociran ORF - od A do P za 16 kromosomov
- črka L ali R- desna (angl. »right«) ali leva (angl. »left«) stran kromosoma (glede na centromerno regijo)
- trimestna številka označuje zaporedno številko bralnega okvirja od centromera na kromosomu
- C (Crick) ali W (Watson) oznaka opiše, na kateri od obeh verig se nahaja ORF (smer branja ORF na kromosomu).

Primer: gen *ARG2* ima ORF oznako YJL071W, ki označuje kvasni ORF lociran na »Watsonovi« vijačnici leve strani kromosoma X in je od centromera 71. bralni okvir.

Posamezni sev iz zbirke delecijских mutant označujemo z izbitim genom, na primer *war1Δ* označuje mutanto iz YKO zbirke z izbitim *WAR1* genom.

Terminologija

ABC transporter	transportni protein, ki s hidrolizo ATP pridobi energijo za prenos substance (angl. »ATP binding cassette«)
alel	gen, ki na homolognem kromosomu uravnava isto lastnost
avksotrofen sev	sev je avksotrofen, če ni sposoben sintetizirati eno ali več rastnih substanc, običajno zaradi mutacij
diploid	evkariontska celica z dvojnimi setom homolognih kromosomov
ekson	del DNA, ki kodira polipeptidno verigo
fenotip	znanji znaki in lastnosti organizma, določa jih genotip v povezavi z okoljem
genotip	vse genetične informacije (vseh alelov) posameznega organizma
haploid	evkariontska celica z enim setom kromosomov
homologa	proteina sta homologa, če imata skupnega prednika, ni nujna ista funkcija
intron	del DNA, ki ne kodira polipeptidne verige
kodon	zaporedje treh nukleotidov DNA ali mRNA, ki kodira eno AK
metalotioneini	transportni proteini za kovine
MRP	skupina proteinov, ki omogočajo rezistenco organizmu na različne kemikalije (angl. »multidrug resistant proteins«)
ortologa	homologa, ki nastaneta z razvojem novih vrst (isti prednik, lahko drugačna funkcija)
paraloga	homologa, ki nastaneta z gensko duplikacijo (isti prednik in funkcija)